

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-274697

⑤ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 昭和61年(1986)12月4日

C 12 Q 1/00
C 07 H 21/00
C 12 N 15/00

8213-4B

6742-4C

7115-4B ※審査請求 未請求 発明の数 4 (全37頁)

⑬ 発明の名称 核酸配列の増幅及び検出方法

⑭ 特 願 昭61-68858

⑮ 出 願 昭61(1986)3月28日

優先権主張 ⑯ 1985年3月28日 ⑰ 米国(US) ⑱ 716975

⑲ 発 明 者 カリー バンクス マ アメリカ合衆国, カリフォルニア 94708, ケンジント
リス ン, ペロイト アベニュー 447
⑲ 発 明 者 ヘンリー アンソニー アメリカ合衆国, カリフォルニア 94602, オークラン
エルリツヒ ド, ローダ アベニュー 3936
⑲ 発 明 者 ノーマン アンヘイム アメリカ合衆国, カリフォルニア 91364, ウッドランド
ヒルズ, ドウ カルブ 22322
⑳ 出 願 人 シタス コーポレイシ アメリカ合衆国, カリフォルニア 94608, エメリイビ
ョン ル, ファイフティサード ストリート 1400
㉑ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

核酸配列の増幅及び検出方法

2. 特許請求の範囲

1. 1種の核酸又は複数の核酸の混合物を含む試料中に少なくとも1種の特定の核酸配列が存在するか否かを検出し、あるいは試料中の2種の異なった配列を区別する方法であって、該試料は該配列を含むと思われるものであり、そして、

(a) 増幅されるべきそれぞれの異なった特定の配列の各鎖用のオリゴヌクレオチドプライマーで、増幅されるべきそれぞれの異なった特定の配列の各鎖について各核酸鎖に相補的な各プライマーの伸長生成物が合成されるようなハイブリダイゼーション条件下、前記試料を処理し、かつここで前記プライマーは、各特定の配列の鎖に実質的に相補的であるように選択され、1つのプライマーから合成された伸長生成物が、それが相補物から分離されたときに他のプライマーの伸長生成物の合成の鋳型としての役割を果たすものであり、

(b) 検出すべき配列が存在すれば、変性条件下で前記試料を処理して鋳型からプライマーの伸長生成物を分離し、

(c) 前記試料をオリゴヌクレオチドプライマーにより、ステップ(b)で生成した各単鎖を鋳型として使用してプライマーの伸長生成物が合成されるように処理して、もし存在するならば前記特定の配列の増幅を生じさせ、

(d) ステップ(c)の生成物に、検出されるべき各配列用であり該配列又はその変異体とハイブリダイズすることができる標識されたオリゴヌクレオチドプローブを加え、そして、

(e) 該ハイブリダイゼーションが生じたか否かを決定する、

ことから成る方法。

2. ステップ(b)と(c)は少なくとも1回繰り返され、ステップ(a)と(c)はプライマーとともにあるいは別に加えられる4つの異なったヌクレオチド三リン酸と重合用試薬により処理することによって行われるものである特許請求の

範囲第1項に記載の方法。

3. 重合用試薬がE・コリ(E.coli)DNAポリメラーゼ、E・コリDNAポリメラーゼIのKlenow断片、T4DNAポリメラーゼ、又は逆転写酵素である特許請求の範囲第2項に記載の方法。

4. 前記核酸が二重鎖であり、そして該鎖がステップ(a)の前に変性により分離され特許請求の範囲第1項～第3項のいずれか1項に記載の方法。

5. 前記核酸がDNAであり、そしてプライマーがデオキシリボスクレオチドである特許請求の範囲第1項～第4項のいずれか1項に記載の方法。

6. 使用される各プライマーは、その5'末端に他のプライマーの制限部位と同じか異なった制限部位を有し、そしてステップ(c)の後であってステップ(d)の前に該各制限部位に特異的な制限酵素によりステップ(c)の生成物を開裂させ、該開裂した生成物を開裂していない生成物と分離し、そしてステップ(d)で使用する特許請求の範囲第1項～第5項のいずれか1項に記載の

方法。

7. 前記特定の核酸配列が遺伝子性疾患、癌性疾患又は伝染性疾患と関連している特許請求の範囲第1項～第6項のいずれか1項に記載の方法。

8. 1又は2以上の核酸を含む試料中の少なくとも1つの特定の核酸配列(該核酸の少なくとも1つがこの配列を含有すると思われる)を検出するためのキットであって、

(a) 検出されるべきそれぞれ異なった配列の各鎖用の1又は複数のプライマーのためのコンテナー(このプライマーは各特定の核酸配列の各鎖に実質的に相補的であって、1つのプライマーから合成された伸長生成物とその相補物から分離されたときに、他のプライマーの伸長生成物合成の鑄型としての役割を果たすことができる)

(b) 重合試薬を収容するコンテナー；

(c) 4つの異なった各ヌクレオシド三リン酸用のコンテナー；

(d) 配列が試料中に含まれるならばその配列とハイブリダイズすることができる標識された

オリゴヌクレオチドプローブを収容するコンテナー；及び、

(e) 該プローブと該配列のハイブリッドを検出する手段を収容するコンテナー；

を有するパッケージタイプの多コンテナー型ユニットから成るキット。

9. 1種の核酸又は複数の核酸の混合物中に含まれる特定の核酸配列をベクター中にクローニングする方法であって、

(a) 増幅されるべきそれぞれの異なった特定の配列の各鎖用のオリゴヌクレオチドプライマーにより、増幅されるべきそれぞれの異なった特定の配列の各鎖について各核酸鎖に相補的な各プライマーの伸長生成物が合成されるような条件下、前記核酸を処理し、かつここで前記プライマーは、各特定の配列の鎖に実質的に相補的であるように選択され、1つのプライマーから合成された伸長生成物が、それが相補物から分離されたときに他のプライマーの伸長生成物の合成の鑄型としての役割を果たすものであり、更に該プライマーはそ

れぞれその5'末端に、他のプライマーの制限部位と同じか異なった制限部位を有するものであり；

(b) その上で単鎖分子が合成された鑄型からプライマーの伸長生成物を分離；

(c) オリゴヌクレオチドにより、ステップ(b)で生産された単鎖分子を、ステップ(b)で生成された各単鎖を鑄型として使用してプライマーの伸長生成物が合成されるように処理し、ここで増幅されるべき特定の配列に依存してステップ(a)と(c)を0から有効量までのジメチルスルフォキシドの存在下、あるいは約45℃までの温度のもとで行い；

(d) ステップ(c)の生成物に各制限部位用の制限酵素を加えて、制限消化中に開裂した生成物を得、そして、

(e) 開裂した生成物を1又は2以上のクローニングベクターに連結する；
ことから成る方法。

10. 合成すべき核酸断片より少ないヌクレオチドを有する既存の核酸断片と2つのオリゴヌク

レオチドとから核酸断片を合成する方法であって、該合成すべき核酸は左方のセグメント、中央のセグメント及び右方のセグメントから成り、該中央のセグメントは少なくとも実質的に前記既存の核酸断片のヌクレオチド配列を意味し、左右のセグメントは2つのプライマーの5'末端に存在するヌクレオチド配列を意味し、これらの3'末端は前記既存の核酸の鎖を分離することにより生ずる単鎖の3'末端に相補的かあるいは実質的に相補的であり；そして、

(a) 各核酸鎖に相補的である各プライマーの伸長生成物が合成されるような条件下で、前記既存断片の鎖を2つのオリゴヌクレオチドプライマーで処理し、ここで、該2つのプライマーは、一方のプライマーから合成される伸長生成物が相補物から分離されたときに他方のプライマーの伸長生成物の合成のための縛型としての役割を果たすように、前記既存断片の各鎖の3'末端と実質的に相補的であるように選択され、そして各プライマーはその5'末端において前記既存断片と相

補的でなく、合成すべき核酸断片の2つの末端に対応するヌクレオチドの配列を含むものであり；

(b) その上でプライマー伸長生成物が生成された縛型からプライマー伸長生成物を分離して単鎖分子を生成せしめ；そして

(c) ステップ(b)において生成した各単鎖を~~プライマー型~~として用いてプライマー伸長生成物が合成される条件下で、ステップ(b)から生じた単鎖分子をステップ(a)のプライマーにより処理し、こうして2つの中間二重鎖核酸分子(このそれぞれは、オリゴヌクレオチドプライマーの一方の5'末端に存在する核酸配列が導入されている)と2つの十分な長さの核酸分子(このそれぞれには、オリゴヌクレオチドプライマーの両方の5'末端に存在する核酸配列が導入されている)とを生成せしめ；

(d) 前記十分な長さの二重鎖分子の有効量を生産するのに十分な回数ステップ(b)とステップ(c)を繰り返す；

(e) ステップ(d)の生成物の鎖を2つの

プライマーで処理して、ステップ(d)の生成物が両末端において伸びるように処理し；そして、

(f) 中央セグメントとしてのステップ

(d)の生成物及びステップ(d)の生成物の鎖を分離することにより生成する単鎖の3'末端と相補的か実質的に相補的である2つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用しながらステップ(a)からステップ(d)までを繰り返す；

ことから成る方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、もしテスト試料中に存在するならばその存在する核酸配列を増幅し、プローブを用いてそれを検出するための方法に関する。より詳細には本発明は、与えられたDNA又はRNA配列から初期に存在する量に比較してより大量の任意の特定の核酸配列を生成せしめ、該配列の検出を容易にする方法に関する。該DNA又はRNAは単鎖又は二重鎖であってもよく、比較的純粋であっても核酸の混合物の一成分であってもよい。本

発明の方法では、所望の核酸配列の増幅を達成するために反応を繰り返す行うようにする。

(従来の技術)

特に診断上の用途のためには、標的核酸配列は問題のDNA又はRNAのほんの僅かな部分であることがあり、非同位体標識又は末端標識オリゴヌクレオチドプローブを使用するのではその存在を検出することは困難である。プローブ検出システムの感度を向上させるために多くの労力が費やされているが、現在利用できる方法を用いて容易に検出できるに十分な量を得るために、標的配列を増幅するような研究は殆ど行われていない。

核酸を初めから、あるいは既存の配列から合成する方法がいくつかの文献に記載されている。これらの方法は、完全に特定された配列の与えられた核酸を大量に生産することを可能にするものである。

核酸を初めから合成する1つの既知方法は、ヌクレオシド誘導体からの核酸の有機合成を含むも

のである。この合成は溶液中又は固体担体上で行われる。有機合成の1つのタイプはリン酸トリエステル法であり、これは遺伝子断片又は短い遺伝子を調製するために利用される。リン酸トリエステル法では、オリゴヌクレオチドが調製され、次にこれは結合されてより長鎖の核酸を形成する。この方法は、S. A. ナーランクらにより、Meth. Enzymol. 68巻90頁(1979年)及び米国特許第4,356,270号に開示されている。該特許は、ソマトスタチン遺伝子の合成とクローニングを開示している。

有機合成の第2のタイプはリン酸ジエステル法であり、これはトランスファーRNA遺伝子の調製に利用されている。この方法はE. L. ブラウンらによりMeth. Enzymol. 68巻109頁(1979年)に開示されている。リン酸トリエステル法と同じように、リン酸ジエステル法もオリゴヌクレオチドの合成を含み、これらが実質的に結合されて所望の核酸が形成される。

上記した初めからの合成法は核酸の長鎖を合成

するために利用されるが、核酸を大量合成するための実用的方法ではない。両法とも労力と時間を消費し高価な装置と試薬を必要としかつ全体収率が低い。全体収率が低いのは、オリゴヌクレオチドの合成とそれらを結合する反応が非効率的であることに起因する。長鎖の核酸を合成する際あるいは短鎖の核酸を大量に合成する場合でさえも、多くのオリゴヌクレオチドを合成し多くの結合反応を行うことが要求される。従ってこれらの方法は任意で所望の核酸を大量に合成するには実用的ではない。

初めに存在する少量の核酸から大量の核酸を生産する方法も存在する。これらの方法は好適な宿主系内での核酸のクローニングを含み、ここでは所望の核酸は宿主の形質変換に使用される好適なベクター中に挿入される。宿主が培養されるとベクターが複製され、所望の核酸のコピーが生産される。核酸断片のサブクローニングについては、T. マニアチスらにより、コールド・スプリング・ラボラトリーのMolecular Cloning 390-401頁

(1982年)に簡単に記述されている。この技術については米国特許第4,416,988号及び4,403,036号にも記述されている。

米国特許第4,293,652号に記載されている核酸の第3の合成法は、上述の有機合成と分子クローニング法を合わせたものである。該法では、所望の核酸配列を作り上げるのに必要な好適な数のオリゴヌクレオチドを初めに合成し、次にこれらを次の挿入の前に増殖により増幅されるベクターに挿入する。

(発明が解決しようとする問題点)

本発明は、この分子クローニング法に幾らかの類似性を有している。しかし本発明はいかなる生物の繁殖をも含まず、従って繁殖に伴って起こり得る危険や不都合を回避することができる。本発明は所望の核酸と関連しない核酸の合成を必要とせず、従って本発明によれば複雑な生物学的混合物からコストをかけて生成物を精製することも回避できる。

本発明はプライマーと重合試薬を用いて1種の核酸又は複数の核酸の混合物中に存在する1又は2以上の特定の核酸配列を増幅し、かつ増幅した配列を検出する方法である。1つのプライマーの伸長生成物は、他のプライマーとハイブリダイズしたときに所望の特定の核酸配列の生成のための鑄型となり、又その逆も起こる。そしてこのプロセスは所定量の配列が生成するまで必要なだけ繰り返される。標的配列から大量の核酸を比較的短時間で生産するためには、本方法は上記の従来法より効率的であると期待される。本方法は核酸混合物に僅かしか含まれていない核酸種を増幅し、該種を効率的に検出するために特に有用である。

(問題点を解決するための手段)

更に特定すると、本発明は、1種の核酸又は複数の核酸の混合物を含む試料中の少なくとも1種の特定の核酸配列が存在するか否かを検出し、あるいは試料中の2個の異なった配列を区別する方法であって、該試料は該配列を含むと思われるも

のであり、

(a) 前記試料を、試料中に存在すると思われるそれぞれの異なった特定の配列の各ストランド用のオリゴヌクレオチドプライマーにより、検出されるべきそれぞれの異なった特定の配列の各ストランドについて各核酸ストランドに相補的な各プライマーの伸長生成物が合成されるようなハイブリダイゼーション条件下で処理し、ここで前記プライマーは、実質的に各特定の配列のストランドに相補的であるように選択され、1つのプライマーから合成された伸長生成物が、それが相補体から分離されたときに他のプライマーの伸長生成物の合成のための鑄型としての役割を果たし；

(b) 検出すべき配列が存在すれば、変性条件下で前記試料を処理して鑄型からプライマーの伸長生成物を分離し；

(c) 前記試料をオリゴヌクレオチドプライマーにより、ステップ(b)で生成した各単鎖を鑄型として使用してプライマーの伸長生成物が合成されるように処理し、もし存在するならば前記

の相補体から分離されたときに、他のプライマーの伸長生成物合成用の鑄型としての役割を果たすことができる)

(b) 重合試薬を収容するコンテナ；

(c) 4つの異なったヌクレオチド三リン酸用のコンテナ；

(d) 前記試料中の前記配列の存在を検出できるプローブを収容するコンテナ；及び

(e) 該プローブと該配列のハイブリドを検出する手段を収容するコンテナ；
を有するパッケージタイプの多コンテナ型ユニットから成る診断用キットに関する。

本発明の更に他の態様によれば、1種の核酸又は複数の核酸の混合物中に含まれる特定の核酸配列をベクター中へクローニングする方法であって、

(a) 増幅されるべきそれぞれの異なった特定の配列の各ストランド用のオリゴヌクレオチドプライマーにより、増幅されるべきそれぞれの異なった特定の配列の各ストランドについて各核酸螺旋に相補的な各プライマーの伸長生成物が合成

特定の配列の増幅を生じさせる；

(d) ステップ(c)の生成物に、検出されるべき配列又はその変異体にハイブリダイズすることができる標識されたプローブを加え；

(e) 該ハイブリダイゼーションが生じたかを否かを決定する；

ことから成る方法を提供する。

ステップ(a)から(c)は、逐次的に行っても同時に行ってもよい。更にステップ(b)と

(c)は配列の増幅が所望のレベルに達するまで繰り返してもよい。

他の態様では本発明は、1又は2以上の核酸を含む試料中の少なくとも1つの特定の核酸配列

(該核酸の少なくとも1つがこの配列を含有すると思われる)を検出するためのキットであって、

(a) 検出されるべきそれぞれ異なった配列の各ストランド用の1又は複数のプライマーのためのコンテナ；(このプライマーは各特定の核酸配列の各ストランドに実質的に相補的であって、1つのプライマーから合成された伸長生成物がそ

されるような条件下、前記核酸を処理し、かつここで前記プライマーは、各特定の配列のストランドに実質的に相補的であるように選択され、1つのプライマーから合成された伸長生成物が、それが相補体から分離されたときに他のプライマーの伸長生成物合成の鑄型としての役割を果たすものであり、更に該プライマーはそれぞれその5'末端に、他のプライマーの制限部位と同じか異なった制限部位を有するものであり；

(b) その上で単鎖分子が合成された鑄型からプライマーの伸長生成物を分離するし；

(c) オリゴヌクレオチドにより、ステップ(b)で生成された単鎖分子を、ステップ(b)で生成された各単鎖を鑄型として使用してプライマーの伸長生成物が合成されるように処理し、ここで増幅されるべき特定の配列に依存してステップ(a)と(c)を0から有効量までのジメチルスルフォキシドの存在下、あるいは約45℃までの温度のもとで行い；

(d) ステップ(c)の生成物に各制限部位

用の制限酵素を加えて、制限消化中に開裂した生成物を得る；そして

(e) 開裂した生成物を1又は2以上のクローニングベクターに連結する；
ことから成る方法に関する。

更に他の態様では、本発明は、合成すべき核酸断片より少ないヌクレオチドを有する既存の核酸断片と2つのオリゴヌクレオチドとから核酸断片を合成する方法であって、該合成すべき核酸は左方のセグメント、中央のセグメント及び右方のセグメントから成り、該中央のセグメントは少なくとも実質的に前記既存の核酸断片のヌクレオチド配列を意味し、左右のセグメントは2つのプライマーの5'末端に存在するヌクレオチド配列を意味し、これらの3'末端は前記既存の核酸のストランドを分離することにより生ずる単鎖の3'末端に相補的かあるいは実質的に相補的であり；そして

(a) 各核酸のストランドに相補的である各プライマーの伸長生成物が合成されるような条件

の一方の5'末端の核酸配列が導入されている)と2つの十分な長さの二重鎖核酸分子(このそれぞれには、オリゴヌクレオチドプライマーの両方の5'末端の核酸配列が導入されている)とを生成せしめ；

(d) 前記十分な長さの二重鎖分子の有効量を生産するのに十分な回数ステップ(b)とステップ(c)を繰り返す；

(e) ステップ(d)の生成物のストランドを2つのプライマーで処理して、ステップ(d)の生成物が両末端において伸びるように処理し；そして

(f) 中央セグメントとしてのステップ(d)の生成物及び、ステップ(d)の生成物の鎖を分離することにより生産される単鎖の3'末端と相補的か実質的に相補的である2つのオリゴヌクレオチドプライマーをして使用しながらステップ(a)からステップ(d)までを繰り返す；
ことから成る方法に関する。

前記中央断片は、

下で、前記既存断片のストランドを2つのオリゴヌクレオチドプライマーで処理し、ここで、該2つのプライマーは、一方のプライマーから合成される伸長生成物が相補体から分離されたときに他のプライマーの伸長生成物の合成のための鑄型としての役割を果たすように、前記既存断片の各ストランドの3'末端と実質的に相補的であるように選択され、そして各プライマーはその5'末端において前記既存断片と相補的でなく、合成すべき核酸断片の2つの末端に対応するヌクレオチドの配列を含むものであり；

(b) その上でプライマー伸長生成物が生産された鑄型からプライマー伸長生成物を分離して単鎖分子を生成せしめ；そして

(c) ステップ(b)において生成した各単鎖をプライマーとして用いてプライマー伸長生成物が合成される条件下で、ステップ(b)から生じた単鎖分子をステップ(a)のプライマーにより処理し、こうして2つの中間二重鎖核酸分子(このそれぞれにはオリゴヌクレオチドプライマー

(a) 他方のオリゴヌクレオチドの3'末端と相補的である核酸配列を3'末端に有し、かつ両5'末端は相互に相補的でない2つのオリゴヌクレオチドを、重合試薬及び4つのヌクレオチド三リン酸と、各核酸ストランドと相補的である各オリゴヌクレオチドの伸長生成物が合成されるような条件下で反応させる；

(b) 該伸長生成物を、それらがその上で合成された鑄型から分離して、単鎖分子を得；

(c) ステップ(b)で生じた単鎖分子を、ステップ(b)で生成された単鎖を鑄型として使用することによりプライマーの伸長生成物が合成されるような条件下で、ステップ(a)のオリゴヌクレオチドで処理して中央断片の増幅を行う；
ことから成るステップにより得ることができる。

(具体的な説明)

プライマー、プローブ、検出すべきオリゴマー断片、オリゴマー対照体、及び標識されていないブロッキングオリゴマーに関して使用される「オ

リボヌクレオチド」という用語は、2又はそれ以上の好ましくは3より多くのデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドから成る分子として定義される。その正確な大きさは多くの因子に依存し、その因子はオリゴヌクレオチドの究極的な機能と用途に依存する。

ここで使用される「プライマー」という用語は、精製された制限消化物として自然に存在しあるいは合成的に調製されたオリゴヌクレオチドを意味し、このプライマーは、例えば好適な温度及びpHでヌクレオチドとDNAポリメラーゼのような重合試薬が存在するような、核酸ストランドに相補的なプライマーの伸長生成物の合成が誘発される条件下に置かれたときに合成開始点として機能することができる。該プライマーは増幅効率を最大にするため単鎖であることが好ましいが、その代わりに二重鎖であってもよい。二重鎖であると、プライマーは伸長生成物を調製するために使用される前にまずその鎖を分離するために処理される。プライマーはオリゴデオキシリボヌクレオ

チドであることが好ましい。プライマーは、重合試薬の存在下で伸長生成物の合成を開始するために十分な長さでなければならない。プライマーの正確な長さは、温度やプライマー源を含む多くの因子に依存する。例えば、目的とする配列の複雑さに依存してオリゴヌクレオチドプライマーは典型的には15から25又はそれより多くのヌクレオチドを含むが、より少ないヌクレオチドを含むものであってもよい。短いプライマー分子は、鋳型とともに十分安定なハイブリッドの複合体を形成するために、より低い温度を要求する。

プライマーは増幅されるべき各特定配列の異なるストランドと「実質的」に相補的であるように選択される。このことはプライマーはそれぞれのストランドとハイブリダイズするに十分に相補的でなければならないことを意味する。従ってプライマーの配列は鋳型の配列を正確に反映する必要はない。例えば相補的でないヌクレオチド断片を、プライマーの配列の残部がストランドに相補的であるようにプライマーの5'末端に結合させても

よい。代わりに、プライマーの配列が増幅されるべきストランドの配列と十分な相補性を有してそれらとハイブリダイズし、それによって他方のプライマーの伸長生成物合成用鋳型を形成するならば、相補的でない塩基又はより長い配列がプライマー内に散在してもよい。

本発明で使用される「制限エンドヌクレアーゼ」及び「制限酵素」という用語は、二重鎖DNAを特定の核酸配列又はその近傍で切断するような細菌性酵素を意味する。

本発明で使用される「DNAの多形現象」という用語は、DNA中の特定部位に2又はそれより多くの異なったヌクレオチド配列が存在できる状態を意味する。

「制限断片長さの多形現象(RALP)」という用語は、特定の制限エンドヌクレアーゼによる消化により形成される制限断片の長さに個体間の相違があることを意味する。

本発明は、核酸中に存在すると思われる1又はそれ以上の所望の特定の核酸配列を増幅する方法

に関する。本法によれば大量の特定の配列を調製できるので、本発明はDNA又はメッセンジャーRNAのクローニング効率を改良し、かつ標的配列を増幅してその検出を容易にするために使用することができる。

一般に、本発明の方法は、用いられる反応ステップの数に比較して指數的な収量で少なくとも1つの特定の核酸配列を生産する連鎖反応を含み、該配列は(a)必要とされる末端が、それとハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを合成できるに十分な程度に詳細に知られており、(b)連鎖反応を開始するための配列が入手可能であることが条件となる。連鎖反応で得られる生成物は、使用した特定のプライマーの末端に対応する末端を有するような個別的な核酸のデュプレックスである。

精製された状態でも精製されていない状態でもよい任意の核酸源を、所望の特定の核酸配列を含むと思われるのであれば、出発核酸として使用できる。従って本法では、例えば単鎖であっても二

重鎖であってもよいDNA又はRNA例えばメッセージRNAを使用することができる。更にそれぞれ1つの鎖を含むDNA-RNAのハイブリッドを使用してもよい。これらの核酸の混合物を使用してもよく、又先行する増幅反応において同じか又は異なったプライマーを用いて生産された核酸を使用してもよい。増幅すべき特定の核酸配列は大きな分子の一部であってもよく、特定の配列が核酸全体を構成するようにはじめから個別的な分子として存在していてもよい。増幅すべき配列は初めから純粋な状態で存在する必要はなく、該配列は、複雑な混合物の小部分、例えば全ヒトDNA中の β -グロビン遺伝子、又は特定の生物学的試料の極く僅かの部分のみを構成する特定の微生物に起因する核酸配列の部分であってもよい。出発物質としての核酸は、同じか又は異なった2以上の所望の特定の核酸配列を含んでいてもよい。従って本発明の方法は、1つの特定の核酸配列を大量に生産するだけでなく、同じか又は異なった核酸分子上に位置する2以上の異なった特定の核

酸配列の同時増幅にも有用である。

核酸は、例えばpBR322のようなプラスミド、クローン化されたDNA又はRNA、又は細菌、酵母、ビールス及び植物や動物などの高級生物等の自然にあるDNA又はRNA等の任意源から得ることができる。DNA又はRNAは、例えばマニアチスらによりMolecular Cloningの280から281頁(1982年)に記載されているような種々の技術により、血や絨毛又は羊膜細胞等の組織物質から抽出することができる。

本発明方法により、任意の特定の核酸配列を生産することができる。配列の両末端の十分な数の塩基が十分詳細に分かっており、これにより所望の配列の異なった複数のストランドに対し、かつ該配列に沿った次のような相対位置にハイブリダイズする2つのオリゴヌクレオチドプライマーを調製することができればよく、すなわち、1つのプライマーから合成伸長した生成物が、鋳型(相補体)から分離されたときに、限定された長さの核酸中へ他のプライマーを伸長させるための鋳型

としての役割を果せばよい。配列の両末端の塩基に関する知識が増加するほど目的とする核酸配列のためのプライマーの特異性も大きくなり、従って本法の有効性も大きくなる。以後使用するプライマーという用語は、特に増幅すべき断片の末端配列に関する情報にいくらかの曖昧さがある場合には、1より大きい数のプライマーを意味するものと理解されるべきである。例えば、核酸配列が蛋白質配列の情報から推測できる場合、遺伝子コードの縮重に起因する全ての可能なコドン変化を示す配列を含むプライマーを集めて各鎖用として使用する。このような集合のうちの1つのプライマーは、増幅すべき所望配列の末端と一致する。

オリゴヌクレオチドプライマーは任意の好適な方法、例えば上記したリン酸トリエステル法及びリン酸ジエステル法又はそれらのオートメーション化された方法を使用して調製することができる。このようなオートメーション化された方法のうちの1つによれば、ビューケーラによりTetrahedron Letters 22巻1859-1862頁に記載されてい

る通り、ジエチルフォスフォロアミダイトを出発物質として使用して合成することができる。修飾された固体担体上でのオリゴヌクレオチド合成の1つの方法が米国特許第4,458,066号に記載されている。生物源(例えば制限エンドヌクレアーゼ消化物)から分離したプライマーを使用することも可能である。

特定の核酸配列は、該配列を鋳型として含む核酸を使用して生産される。核酸が2つの鎖を含んでいるときは、別のステップとしてでもプライマーの伸長生成物の合成と同時にでもよいが、該核酸は鋳型として使用される前に鎖を分離する必要がある。この鎖分離は、物理的、化学的及び酵素的の方法を含む任意の好適な変性法により行うことができる。核酸の鎖を分離する1つの物理的方法は、完全に(99%以上)変性されるまで核酸を加熱することを含む。典型的な加熱変性は80から150℃で1から10分間加熱することを含む。鎖の分離は、ヘリカーゼ、又はヘリカーゼ活性を有しリボATPの存在下でDNAを変性させるもの

として知られる酵素 *R e c A* として知られる酵素類からの 1 酵素により誘発させることもできる。ヘリカーゼで核酸の鎖を分離するのに好適な反応条件はクーン ホフマン ペーリングにより *CSH-Quantitative Biology* の 43 から 63 頁 (1978 年) に記載され、*R e c A* を使用する技術は、C. ラディングにより *Ann. Rev. Genetics* の 16 巻 405 から 437 頁に記載されている。

増幅すべき配列を含む当初の核酸が単鎖であると、その相補体をそれに 1 つ又は 2 つのオリゴヌクレオチドプライマーを加えて合成する。好適な単一プライマーが加えられると、プライマー、重合試薬及び後述する 4 つのヌクレオチドの存在下でプライマーの伸長生成物が合成される。生成物は部分的に単鎖の核酸と相補的で、核酸鎖とハイブリダイズして長さの異なるデュプレックスを形成し、これは上記した通り単鎖に分離され、相補的な 2 つの分離された鎖となる。代わりに 2 つの好適なプライマーを単鎖に加えて反応を行うこともできる。

することはできない。しかし実際には、増幅すべき配列が複雑な長鎖の核酸鎖の混合物中に含まれる場合には、加えられるプライマーの量は相補的な鎖 (鋳型) の量よりも通常モル過剰とする。本法の効率を改良するためには、大きな過剰モル比とすることが好ましい。

デオキシリボヌクレオチド三リン酸であるデオキシ ATP、デオキシ CTP、デオキシ GTP 及び TTP の十分な量も合成混合物に加え、生成する溶液を約 90 - 100℃ で約 1 から 10 分、好ましくは 1 から 4 分間加熱する。この加熱時間の後、溶液の温度をプライマーのハイブリダイゼーションに好適な 20 - 40℃ まで下げる。この冷却した混合物に重合試薬を加え、従来知られている条件下で反応を行わせる。この合成反応は、室温からそれを越えると重合試薬が効率的に機能しない温度までの間で行わせることができる。従って例えば DNA ポリメラーゼを重合試薬として使用するとき、温度を通常 45℃ 以上に上昇させない。シグナルを検出するのに有効な量のジメチルスル

当初の核酸が増幅すべき配列を構成するならば、プライマーの伸長生成物は当初の核酸の鎖と完全に相補的となり、ハイブリダイズして同じ長さの鎖から成るデュプレックスを形成し、これは分離されて単鎖の分子となる。

核酸の相補的な鎖が分離すると、当初の核酸が二重鎖であっても単鎖であっても、その鎖は他の核酸鎖の合成用鋳型として容易に使用することができる。この合成は任意の好適な方法を用いて行うことができる。通常それは好ましくは pH が 7 から 9、最も好ましくは 8 である緩衝水溶液中で起こる。好ましくは過剰のモル比 (クローン化された核酸については、通常プライマー対鋳型が 1000 : 1、そしてゲノムの核酸については通常プライマー対鋳型が 10^6 : 1) の 2 つのオリゴヌクレオチドプライマーを分離された鋳型鎖を含む緩衝水溶液中に加える。しかし本法を診断的用途に使用する場合には相補的な鎖の量は既知ではないことを理解すべきであり、従って相補的な鎖の量に関連するプライマーの量を確信をもって決定

フォキシド (DMSO) を存在させ、又は温度を 35 - 40℃ とすることが好ましい。最も好ましいのは、5 - 10 容量% の DMSO を存在させ、温度を 35 - 40℃ とすることである。増幅すべき配列が HLA-DQ- α 又は - β 遺伝子のような 110 を越える塩基対断片であるような用途の場合には、有効量 (例えば 10 容量%) の DMSO を増幅用混合物に加えかつ反応を 35 - 40℃ で行って、検出できる結果を得るか又はクローニングを可能にする。

重合試薬は、プライマーの伸長生成物の合成を達成できるものならば、酵素を含むどのような化合物でも系でもよい。この目的のための好適な酵素は、例えば E. コーリー DNA ポリメラーゼ I、E. コーリー DNA ポリメラーゼ I のクレノー断片、T4 DNA ポリメラーゼ、他の入手できる DNA ポリメラーゼ、逆転写酵素及び耐熱性酵素を含む他の酵素を含み、これらは好適な方法でヌクレオチドの結合を容易にし、各核酸鎖と相補的であるプライマーの伸長生成物を形成する。一般に

合成は各プライマーの3'末端から始まり、合成が終了するまで鋳型鎖に沿って5'末端方向に向かって進行し、異なった長さの分子を生成する。しかし上述の方法と同じ方法を用いて5'末端で合成を始め、他の方向に向かって反応を進行させる試案がある。

新たに合成された鎖とそれと相補性を有する核酸鎖は、本法のその後のステップにおいて使用される二重鎖分子を形成する。次のステップでは、二重鎖分子の鎖は上述の任意の手順を用いて分離され、単鎖分子を提供する。

新たな核酸が該単鎖分子上で合成される。追加の誘導試薬、ヌクレオチド及びプライマーを、上記に規定した条件下で反応を進行させるために必要ならば加えてもよい。オリゴヌクレオチドプライマーの一末端から再度合成が始まり、そして鋳型の単鎖に沿って進行して他の核酸を生成する。このステップの後における伸長生成物の半分は2つのプライマーが結合した特定の核酸配列から成っている。

た場合には、熱に対して不安定である酵素の場合がそうであるように、各鎖分離ステップ後に重合試薬を補充することが必要である。ヘリカーゼのような酵素的手段を含む多数の精製された成分を鎖分離ステップで使用する場合は、同時的方法を使用することができる。同時的方法では、反応混合物は、所望の配列を含む核酸鎖の他に、鎖分離酵素（例えばヘリカーゼ）、r ATPのような鎖分離酵素への適切なエネルギー供給源、4つのヌクレオチド、モル過剰のオリゴヌクレオチドプライマー及びE. コーリーDNAポリメラーゼIのクレノー断片のような誘導試薬を含むことができる。同時的方法で変性のために熱を使用するときは、誘導試薬に依存するが好ましくは65-90℃の高温で機能する熱安定性ポリメラーゼ等の熱安定性誘導試薬を使用し、この温度で核酸は平衡状態にある単鎖と二重鎖から成っている。長さの短い核酸には、約50℃程度の低温が採用される。どの程度の高温が使用できるかは、その温度で酵素が失活するかあるいはプライマーのハイ

ブリダイゼーションが不十分な程度しか起こらないかどうかに依存する。このような熱安定性酵素は、例えばA. S. カレディンらにより*Biokhimiya* 45巻644-651頁(1980年)に記載されている。本法の各ステップは、全ての試薬が始めから存在するにもかかわらず、続いて起こる。必要ならば追加の試薬を加えてもよい。適切な長さの時間が経過して所望量の特定の核酸配列が生成した後、任意の公知方法で酵素を失活させるか反応成分を分離するかして反応を停止させる。

最初の核酸又は核酸の混合物から2以上の特定の核酸配列を生成することが望ましい場合は、好適な数の異なったオリゴヌクレオチドプライマーを使用する。例えば2つの異なった特定の核酸配列を生成する場合には、4つのプライマーを使用する。プライマーのうちの2つは特定の核酸配列のうちの1つに関するもので、他の2つのプライマーは第2の特定の核酸配列に関するものである。これにより、2つの異なった特定の配列が本法を用いて指数的に生産され得る。本発明は、各ステップ後に新しい試薬を加える段階的方法、又は全ての試薬を初期のステップで加える同時的方法、又はある与えられた数のステップの後に新しい試薬を加える一部段階的で一部同時的方法のいずれによっても行うことができる。熱処理のように重合試薬を不活性化する鎖分離方法を採用し

ブリダイゼーションが不十分な程度しか起こらないかどうかに依存する。このような熱安定性酵素は、例えばA. S. カレディンらにより*Biokhimiya* 45巻644-651頁(1980年)

に記載されている。本法の各ステップは、全ての試薬が始めから存在するにもかかわらず、続いて起こる。必要ならば追加の試薬を加えてもよい。適切な長さの時間が経過して所望量の特定の核酸配列が生成した後、任意の公知方法で酵素を失活させるか反応成分を分離するかして反応を停止させる。

本発明方法は連続的に行ってもよい。オートメーション化された方法の一態様として、反応を、変性区域、試薬添加区域及び反応区域を通過してサイクルさせるような方法がある。他の態様では、プライマーの伸長生成物の合成に使用する酵素をカラム中で固定化することができる。他の反応成分は連続するカラムと加熱用コイルを通過するようにポンプを使って連続的に循環され、これにより、生成した核酸が酵素を失活させることなく繰り返

し変性される。

本発明の概略が下記に示され、ここでは相補的な鎖 (S^+) と (S^-) から成る所望配列 (S) を含む二重鎖DNAが核酸として使用されている。第1の及び引き続いて起こる反応サイクルでは、当初の鑄型上の各オリゴヌクレオチドプライマーの伸長は、プライマーの1つとともにのみ終了する制限のない長さの、1つの新しいssDNA分子生成物を生成する。以後「長鎖生成物」と呼ぶこれらの生成物は直線的に蓄積し、つまり任意数のサイクルの後に存在する量はサイクル数に比例する。

このように生産される長鎖生成物は、引き続いて起こるサイクルの間一方又は他方のオリゴヌクレオチドプライマーの鑄型として機能し、所望配列 (S^+) 又は (S^-) の分子を生成する。これらの分子も一方又は他方のオリゴヌクレオチドプライマーの鑄型として機能し、更に他の (S^+) 及び (S^-) を生成し、従ってサイクル数に関連して指數的に (S) の蓄積を生じさせる連鎖反応

が維持される。

オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションにより形成される意図されない副生成物は、それ自身触媒活性がなく（稀な例を除く）、従って直線的に蓄積する。

以下余白

増幅される特定の配列 (S) は、次のように図示される。

(S^+) 5' AAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCC 3'

(S^-) 3' TTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGG 5'

好適なオリゴヌクレオチドプライマーは、

プライマー1: GGGGGGGGGG

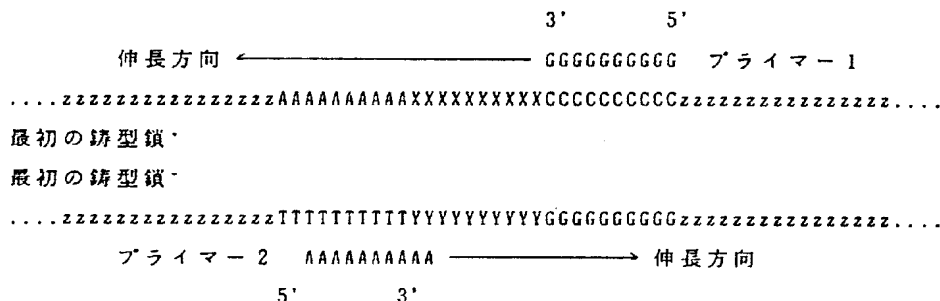
プライマー2: AAAAAAAAAA

であり、もし (S) を含むDNA:

.....zzzzzzzzzzzzzzzzzzAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCzzzzzzzzzzzzzzzzzz.....

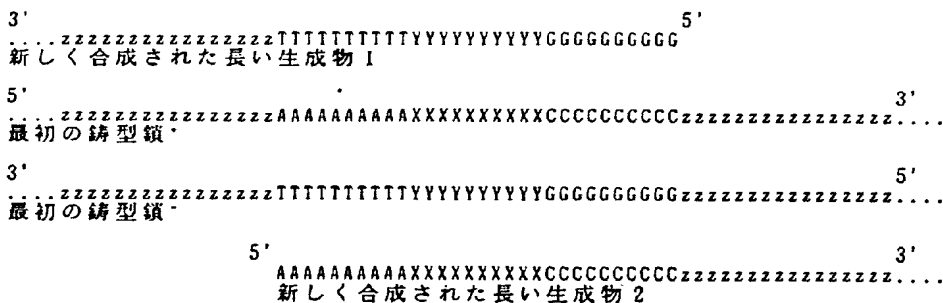
.....zzzzzzzzzzzzzzzzzzTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGGGzzzzzzzzzzzzzzzzzz.....

が分離されて単鎖になり、その単鎖がプライマー1又はプライマー2とハイブリダイズすると、次の伸長反応が4種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸の存在下でDNAポリメラーゼで触媒され得る。

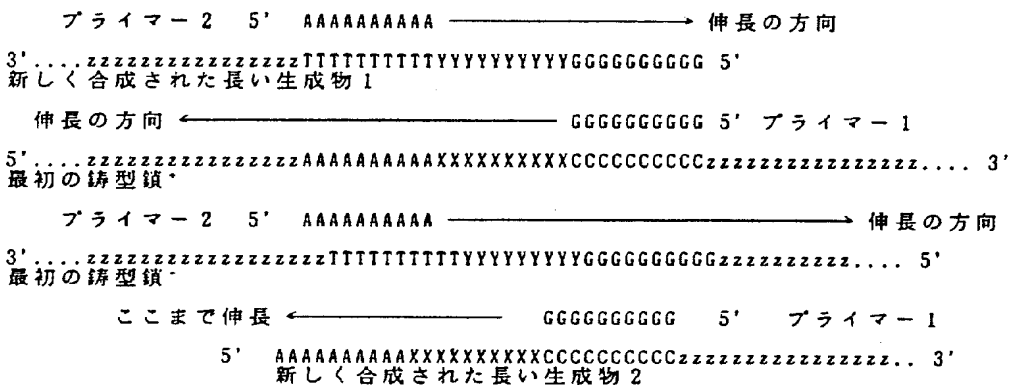


以下余白

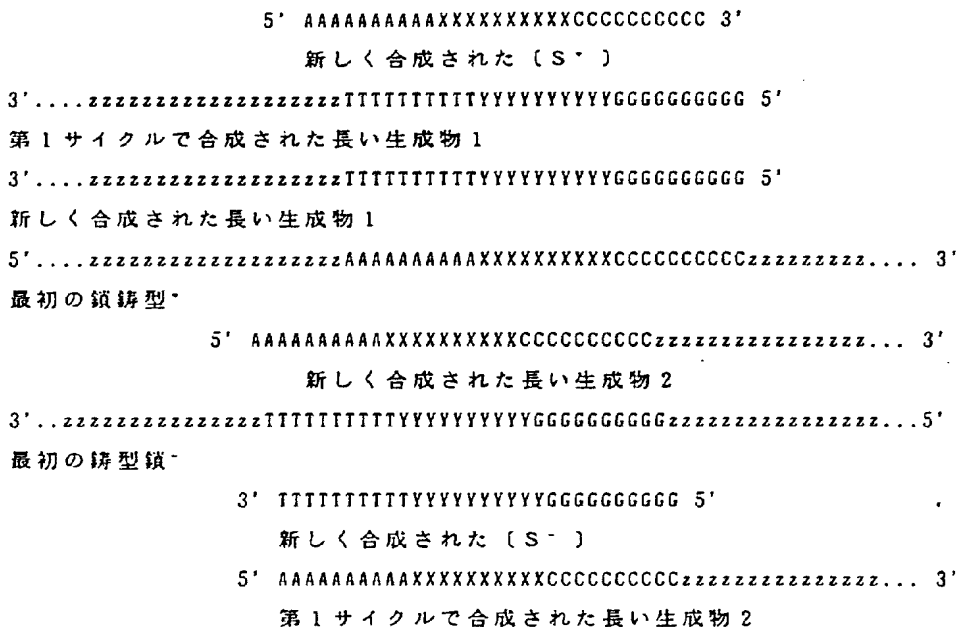
形成された2つのデュプレックスの変成により次の生成物が生ずる。



上記4つの鎖が次のサイクルにおいてプライマー1及び2と再ハイブリダイズすれば、重合剤は次の反応を触媒する。



上記4つのデュプレックスが分離されると次の鎖が生ずる。



以下余白

一方のプライマーのオリゴヌクレオチド配列と共に終る鎖及び他方の相補的配列の各鎖は、生産することが望まれている特定の核酸配列(S)であることが分かる。

本法のステップは、プライマー1及び2、重合試薬及び存在するヌクレオチドの量によってのみ限定される以外、無限に繰り返すことができる。検出のためには、例えば試料の特性に依存する量である検出できるシグナルを発生させるために要求される回数のサイクルを実施する。例えば試料が純粋か希釈されたものならば、複雑な混合物であるものよりも、少ない回数しか要求されない。試料がヒトのゲノムDNAであると、サイクルの回数は、約10-50回が好ましい。

最初の核酸は複製されないで、その量は全工程中一定である。長鎖生成物は最初の核酸からのみ生産されるので、その量は直線的に増加する。特定の配列の量は指数的に増加する。従って特定の配列はその量が増加して優勢な成分となる。このことは次表に示され、該表は各サイクルの効率

が100%であるとした場合のnサイクル後の理論的に存在する成分量を比較したものである。

0 から n サイクル後の二重鎖の数

サイクル数	鋳型	長鎖生成物	特定配列(S)
0	1	—	—
1	1	1	0
2	1	2	1
3	1	3	4
5	1	5	26
10	1	10	1013
15	1	15	32,752
20	1	20	1,048,555
n	1	n	$2^n - n - 1$

単鎖の核酸を鋳型として使用すると、サイクルあたり1つの長鎖生成物が生成する。

本法は好適な発現ベクターに特定の核酸配列を挿入するためにクローン化するのに使用できる。該ベクターは適切な宿主生物を形質転換して標準

的な組み換え体DNA技術により遺伝子生成物を生産する際に使用できる。

通常このようなクローニングはベクターへの直接の連結反応又はオリゴヌクレオチドリンカーの付加とそれに引き続く制限酵素による開裂を含んでいる。しかし両法とも反応性が不十分である平滑末端の連結反応を含んでいる。更に両法ともクローニングベクターへの増幅された生成物を挿入する際の位置とその数を制御することができない。

本増幅工程では、最初の鋳型核酸、期待される標的増幅生成物及び種々のバックラウンド非標的生成物に由来する核酸の混合物が得られる。最初の鋳型DNAが、例えばヘテロ接合二量体遺伝子中におけるような多数の標的配列を含むか、又は一連の関連した遺伝子群がある場合にも、増幅された生成物は混合物となる。

本法のプライマーを、増幅反応で生産されるDNA混合物の迅速かつ特異的なクローニングを補助するために修飾してもよい。このような修飾では、同じか又は異なった制限部位がプライマーの

5'末端に導入されて増幅された生成物の2つの末端に制限部位が生じる。好適な酵素で切断すると、増幅された生成物は容易にプラスミド又はベクター中に挿入されクローニングされる。このクローニングは、混合物ではなく、個々の増幅された生成物分析又は発現を可能にする。

同じ制限部位を両プライマーに使用することができ、異なった制限部位を使用すると生成物を特定の方向にベクターに挿入することができ、かつ2つのプライマーのうちの1つのみに起因する増幅から生ずる挿入だけでなく多数の挿入も抑制することができる。単鎖配列決定用ベクターへクローニングする場合、単鎖ハイブリダイゼーションプローブが使用される場合、及びクローン化された生成物が発現されるべき場合には、特定方向へ挿入することが有用である。

プライマーを調製する1つの方法は、標的配列と僅かしか異ならないプライマー配列を選択することである。各プライマーが位置すべき領域は、所望のベクターに好適な制限部位に相同であるよ

うにスクリーニングされる。例えば "CAGTATCCGA... " という標的配列は、Bam HI部位を含む配

と僅かに一塩基が異なるにすぎない。プライマー配列はその3'末端において目的物に正確にマッチしかつその5'末端の近傍に変形した配列と制限部位を有するように選択される(例えば "CAGgATCCGA.. " の小文字は標的配列とマッチしていないことを意味する)。この僅かに変化した配列は最初の標的配列とハイブリダイズし重合を開始するプライマーの能力を妨げるものではない。第1の増幅サイクルの後、プライマーはコピーされ、標的となり、かつ新しいプライマーと正確にマッチする。増幅工程後、生成物は適切な制限酵素で開裂され、そして必要ならば脱塩カラム又は分子量クロマトグラフィーカラムを通してヌクレオチド三リン酸や塩等の連結阻害剤を分離され、そして連結反応によりバクテリオファージM13のようなクローニングベクターに挿入される。遺伝子は、周知の技術を用いて配列決定され、そして/又は発現される。

が最初の鋳型と正確に相補的でない場合のポリメラーゼ連鎖反応の生成物は鋳型よりむしろプライマー配列を有し、これによりインビトロの突然変異を可能にする。引き続きサイクルでは、より以上のミスマッチがプライミングが必要とされないで、この突然変異が減ることのない効率下で増幅される。このように生産された突然変異体は標準的な分子生物学的技術により適切なベクター中へ挿入され、変化した蛋白質を生産する能力等の変化した特質をこのベクターに与える。

上述した変化したDNA配列を形成する方法は、より以上の配列変化を誘発させるために異なったプライマーを使用して該変化したDNAに対して繰り返すことができる。この方法では、一連の突然変異配列が徐々に生成され、ここでこの一連のものに新しく加えられるものは、最後のものと僅かに異なることができるが、最初のDNA源配列とは非常に大きく異なることができる。この方法では、非常に大きなミスマッチの場合にプライマーが機能しないために単一ステップでは行うこと

プライマーを調製する第2の方法は、プライマーの3'末端を標的配列から採用し、そしてプライマーの5'末端に所望の制限部位を付加することを含む。この例としてHindIIIが配列 "cgaagccttCAGTATCCGA... " を形成するために付加され、ここで小文字の意味は上記の通りである。加えられた塩基は増幅の第1サイクルのハイブリダイゼーションには寄与しないが、その後のサイクルにおいてマッチする。増幅された最終生成物は制限酵素で切断され、上記の通りクローニングされ、そして発現される。増幅される遺伝子は、例えばヒトの β -グロブリン^{EF}、又はヒトのHLA-DQ、DRもしくはDP- α 及び β 遺伝子である。

更に本法はインビトロの突然変異用として使用することができる。オリゴデオキシリボヌクレオチドは増幅されるべきDNA配列と正確に相補的である必要はない。これらは、ポリメラーゼ酵素や他に使用されるいずれかの誘導試薬によって伸長されるために十分な程度に、鎖とハイブリダイズすることができればよい。使用するプライマー

のできない変化を、最終的には作り出すことができる。

更に、十分な量のプライマーが増幅される鎖に相補的である配列を含むのであれば、プライマーはその配列の一部として相補的でない配列を含むことができる。例えば鋳型配列に相補的でない核酸配列(例えばプロモーター、リンカー、コード配列等)を、1つ又は両方のプライマーの5'末端に結合させることができ、これにより増幅工程の生成物にこれを付加することができる。伸長プライマーを添加した後、相補的でない核酸挿入部を含む新しい鋳型の所望量を得るために十分な数のサイクルを実施する。これにより簡単な技術を用いて比較的短時間(例えば2時間又はそれ以下)内に組合わされた断片を大量に生産することが可能になる。

更に本法においては、最初の短い核酸断片の鎖を分離することにより生成する単鎖の3'末端に相補的あるいは実質的に相補的である3'末端を有し、かつ5'末端が中央切片に付加されるべき配列

の情報を含むものであるプライマーを使用して、生成物より短鎖である既存の核酸断片（これを中央セグメントという）から核酸断片を合成することができる。この方法は、

(a) 各核酸鎖に相補的である、各プライマーの伸長生成物が合成される条件下で、該既存の断片の鎖を2つのオリゴヌクレオチドプライマーで処理し、ここで該2つのプライマーは、一方のプライマーから合成される伸長生成物とその相補体から分離されたときに他方のプライマーの伸長生成物の合成のための鋳型としての役割を果たすことができるように、前記既存断片の各鎖の3'末端と実質的に相補的であるように選択され、そして各プライマーはその5'末端において前記既存断片と相補的でなくかつ合成される核酸断片の2つの末端に対応するヌクレオチド配列を含むものであり；

(b) その上でプライマーの伸長生成物が合成された鋳型からプライマーの伸長生成物を分離して単鎖分子を生成せしめ；

実質的に相補的である2つのオリゴヌクレオチドプライマーをして使用しながらステップ(a)からステップ(d)までを繰り返す；
ことから成る方法である。

ステップ(b)とステップ(c)は必要なだけ通常少なくとも5回繰り返して、最終生成物を合成するために必要な量（すなわち、有効量）の十分に長い二重鎖生成物を生産する。更に中央のセグメントを、先行する増幅サイクルの生成物として得ることができる。ステップ(d)の生成物は伸長又は増幅の新たなサイクルの前に精製され、又は生成物を含む反応混合物とし直接使用する。

プライマーの3'末端が最初の一層短い鎖の核酸の単鎖の3'末端と正確に相補的でないときは、生成物の中央のセグメントは該最初の一層短い鎖の核酸にある配列情報と正確に同じではない。従って最初の核酸の変異体を、その3'末端が最初の一層短い鎖の核酸の単鎖の3'末端と実質的に相補的であるプライマーを用いて作り出すことができる。

制限部位リンカーがプライマーに導入されると、

(c) ステップ(b)から生じた単鎖分子をステップ(a)のプライマーにより、ステップ(b)において生成した各単鎖をプライマーとして用いてプライマー伸長生成物が合成される条件下で処理し、こうして2つの中間二重鎖核酸分子（このそれぞれには、オリゴヌクレオチド^{鋳型}の一方の5'末端に存在する核酸配列が導入されている）と2つの十分に長い二重鎖核酸分子（このそれぞれには、オリゴヌクレオチドプライマーの両者の5'末端に存在するヌクレオチド配列が導入されている）を生成せしめ；

(d) 前記十分な長さの二重鎖分子の有効量を生産するのに十分な回数ステップ(b)とステップ(c)を繰り返す；

(e) ステップ(d)の生成物の鎖を2つのプライマーで処理して、ステップ(d)の生成物が両末端において伸びるようにし；そして

(f) 中央セグメントとしてのステップ(d)の生成物及びステップ(d)の生成物の鎖を分離することにより生成する単鎖の3'末端と相補的か

増幅された二重鎖生成物が適切な制限酵素で消化され、迅速なクローニング及び配列決定のためにM13ベクター中に直接連結される。特定の増幅された標的配列を有するM13溶菌斑は、標的配列に特異的なプローブと溶菌斑のリフトフィルターをハイブリダイズせしめることにより同定することができる。

本法は、伝染性疾患、遺伝子性疾患又は細胞性疾患、例えば癌、と関連する特定の核酸配列、例えば発癌遺伝子、の検出及び／又は特徴付けを可能にするために使用される。増幅は、例えば胎児細胞から得られるDNAを用いる鎌状赤血球貧血の胎児診断等、分析に利用できる核酸の量が非常に小さい場合に有用である。増幅は、本来的に感度の良くない非放射性検出技術を用いて少量の試料を分析する場合、又は放射性技術を用いるが迅速な検出が望ましい場合に特に有用である。

本発明の目的のためには、遺伝子性疾患は、例えば鎌状赤血球貧血、囊胞性繊維症、 α -サラセミア、 β -サラセミア等の、任意の生物体からの

ゲノムDNA中の特定の欠損及び／又は変異を含む。鎌状赤血球貧血は本法による好適なDNA配列の増幅の後のオリゴマー制限分析又はRFLP分析を経て容易に検出することができ、 α -サラセミアは配列が存在しないことにより検出することができ、 β -サラセミアは疾患を起こさせる変異に近接してリンクする多形性 (polymorphic) 制限部位の存在により検出することができる。

これら全ての遺伝子性疾患は適切な配列を増幅し、それを放射性プローブを使用せずにサザンブロット法により分析して検出することができる。このような方法では、例えば非常に少量の所望配列を含む羊水からのDNAの少量の試料を増幅し、制限酵素で切断し、そしてサザンブロット法で分析する。増幅シグナルをハイレベルとすることにより、非放射性標体を使用することが容易になる。

他の態様では、少量のDNAを便利なレベルまで増幅し、次に更に伸長反応を行うが、この場合容易に検出できるヌクレオチド誘導体 (例えば ^{32}P 又はビオチンでラベルしたヌクレオチドトリ

ン酸) を直接最終のDNA生成物に導入し、これを制限分析及び電気泳動分析あるいは任意の他の好適な方法を用いて分析する。この技術のモデル系の例を第5図に示してある。

第3図のモデル系に示した更に他の態様では、核酸は増幅の前に特定の制限エンドスクレアーゼに暴露する。切断された配列は増幅できないので、予め制限酵素で処理したDNA試料の存在にもかかわらず増幅された断片が現れることは増幅された配列中にエンドスクレアーゼの部位がないことを暗示する。増幅された配列が存在するか否かは適当な方法で検出することができる。

この技術の実際的な適用方法は、本明細書とサイキらによる *Biotechnology* 3巻1008-1012頁に記載されているオリゴマー制限技術を用いて鎌状赤血球貧血の検出を容易にする使用により例示することができる。鎌状赤血球貧血は β -グロビン遺伝子の第6コドンの1つの塩基対の変化により生ずるヘモグロビンの疾患である。第6図は多形現象 (polymorphism) 領域中の正常及び鎌状赤血

球貧血の β -グロビン遺伝子の配列を示すもので、一本線は正常遺伝子にのみ存在する Dde I 部位の位置を示し、二本線は正常及び鎌状赤血球貧血対立遺伝子の両方に存在する非多形性の Hinf I 部位の位置を示す。第7図は両制限部位間隔にわたり星印で示された部分がラベルされているプローブを用いて正常の β -グロビンDNAをオリゴマー制限開裂する方法を示すものである (プローブは、制限部位からの塩基対の数が、制限部位から他の末端までの塩基対の数より少なくなる方の末端にラベルすることが好ましい)。前に記載したようにして増幅されたDNAが変性され、ラベルされたプローブとアニールされる。増幅は、2次構造の形成を最小に抑えるためにジメチルスルフォキシドの存在下温度を上げて (35-40℃) 実施する。酵素 Dde I はDNAを再構成された Dde I 部位で開裂させ、ラベルされたオクタマーを生じさせる。テストに使用した条件下では、オクタマーはデュプレックスから離れるのに十分な短さである。引き続き酵素 Hinf I の添加は今や単

鎖であるオクタマーに何の影響も与えない。第8図は β -グロビンDNAの鎌状赤血球対立遺伝子に適用した前記と同じ方法を示す。酵素 Dde I は、A-Aの塩基対がミスマッチしたものであるため、増幅されたDNAとラベルされたプローブとで形成されたデュプレックスを開裂させることはできない。しかし酵素 Hinf I はハイブリッド制限開裂せしめ、ラベルされたトリマーが生成される。実際にはこの方法は、特定のシグナルがいずれかの対立遺伝子の存在と関連するので、個体のDNAが野生型のコモ接合体か、鎌状赤血球貧血型のコモ接合体か又は鎌状赤血球貧血形質を有するヘテロ接合体であるかを検診することができる。上述の方法を使用して適切な配列を増幅させることにより1つの ^{32}P ラベルのみを有するプローブを用いて単コピー遺伝子を迅速に分析することができる。

種々の伝染性疾患は、原因となる微生物に特異的である特定のDNA配列の臨床試料中での存在により診断することができる。これらはサルモネ

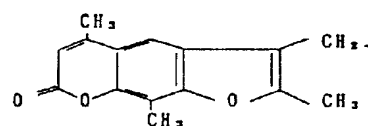
ラ、クラミジア、ネisseria等の細菌、肝炎ウイルス等のウイルス、マラリアの原因となるプラズモジウム(Plasmodium)等の寄生体を含む。ファルコーに与えられた米国特許第4,358,535号は、伝染性疾患の診断用の特別なDNAハイブリダイゼーションプローブの使用につき記述している。ファルコー法に固有の問題は、感染した患者からの臨床試料中には比較的少ない数の病原生物しか存在せず、これらから抽出されたDNAは試料中の全DNAの非常に小さな部分を構成するのみであるということである。DNA試料を固定化しハイブリダイゼーション検出する前に問題となっている配列を特異的に増幅することは、これらの方法の感度と特異性を大きく改良する。

伝染性疾患の診断用にDNAプローブを臨床的にルーチン化して使用することは、ワードのヨーロッパ特許第63,879号に記載されているように非放射的にラベルされたプローブを使用するのならば、大いに簡略化される。この方法では、ビオチンを含むDNAプローブがアビジン又はビオチン

に特異的な抗体に結合した色素体(chromogenic)酵素により検出される。この型の検出は便利であるが、比較的低感度である。本法による特異的なDNA増幅と安定にラベルされたプローブを組み合わせるにより、ファルコー及びワードの方法をルーチン化した臨床における有用な方法に実施するのに要求される便利さと感度を提供することができる。

更にプローブは、ビオチンが次式のスパーサーアーム

$$-Y-(CH_2)_x-O-[(CH_2)_xO]_y-CH_2CH_2-NH-$$
に結合したビオチン化したプローブとしてもよく、ここでYは、O、NH又はN-CHO、xは1から4までの数、そしてyは2から4までの数である。そして次にスパーサーアームは次式のブソラレン成分に結合している。



ブソラレン成分は、クラージ・テッペにより Bioc. m. Biophys. Acta, 697 巻1-5頁(1982年)に記載されているように「ギャップのある環状」のプローブに挿入しかつ架橋し、ここでギャップのある環の単鎖ハイブリダイゼーション領域はプライマーに含まれる領域にわたる。

この増幅工程は単一コピーのヒト遺伝子から十分な量のDNAを調製するのに利用することもでき、これにより臭化エチジウムのような簡単な非特異的なDNA染色によりそれを検出でき、直接DNA診断を行うことができる。

伝染性疾患及び生物体のゲノム中の病原的異常性を検出するほか、本法は任意の病原状態と関連しないDNA多形現象(ボルモルフィズム)を検出するために使用することもできる。

次の実施例は例示のために提示するもので、どのようなにも本発明を限定することを意図するものではない。これらの実施例で全てのパーセントは固体の場合は重量で、液体の場合は容量であり、他に指定がない限り温度は摂氏温度である。

実施例1

次のスクレオチド配列を有する25塩基対配列

5' CCTCGGCACCGTCACCGCTGGATGCT 3'

3' GGAGCCGTGGCAGTGGGACCTACGA 5'

(ATCCから得られるpBR322の47塩基対Fok I制限断片上に含まれる)を次のように調製した。47塩基対断片を含むpBR322のFok I消化物を供給者であるニューイングランド社の指示による条件に従ってpBR322をFok Iで消化することにより調製した。使用したプライマーは、5'd(CCTCGGCACCG)3'と5'd(AGCATCCAGGGTC)3'であり、通常の技術により調製した。25mMのリン酸カリウムと10mMの塩化マグネシウム、及び100mMの塩化ナトリウムから成る緩衝液(pH7.5)33μlに2433ピコモルの上述の各プライマー、2.4ピコモルのpBR322のFok I消化物、2.2ナノモルのデオキシATP、2.2ナノモルのデオキシCTP:1.9ナノモルのデオキシGTP及び1.0ナノモルのTTPを加えた。

混合物を85℃で5分間加熱し、室温まで冷却

した。E. コーリー DNA ポリメラーゼ I のクレノー断片の 5 単位を加え、温度を 15 分間維持した。その後再度 85℃ で 5 分間加熱し、冷却した。クレノー断片の 5 単位を再度加え、15 分間反応を行った。加熱、冷却及び反応の各ステップを更に 11 回繰り返した。

最後の繰り返しの後、5 μ l を反応混合物から取り出した。これを 85℃ で 3 分間加熱し、室温に冷却した。12.5 ピコモルの α -P³²-デオキシシチジン三リン酸と 5 単位のクレノー断片を加え反応を 15 分間進行させた。ラベルされた生成物をポリアクリルアミドゲルの電気泳動で確認した。13 サイクル後に見える強くラベルされたバンドのみが、意図する 25 塩基対配列であった。

実施例 2

増幅されるべき所望の配列は、ヒトの β -グロブリン遺伝子に含まれかつ鎌状赤血球貧血に関する Mst II 部位に伸びる 94 塩基対の配列であった。該配列は第 1 図に示すヌクレオチド配列を有して

あり、脱トリチル化の間に解離するジメトキシトリチルアルコールを集め分光器による検査で決定した。

オリゴデオキシリボヌクレオチドを脱保護化し、精製する方法

固体担体をカラムから取り出し、1 ml の濃水酸化アンモニウムに閉鎖管中室温で 4 時間曝した。担体を濾過で取り除き、一部が保護されたオリゴデオキシリボヌクレオチドを含む溶液の温度を 55℃ に上昇させ、5 時間維持した。アンモニアを取り除き、残渣を調製用ポリアクリルアミドゲルに適用した。30 ボルト/cm で 90 分間電気泳動を行い、生成物を含むバンドを蛍光プレート上の UV シャドウイングで同定した。該バンドを切り取り、1 ml の蒸留水で一晩かけて 4℃ で溶出した。この溶液をアルテック RP18 カラムにかけ、pH 6.0 の 1% 酢酸アンモニウム緩衝液中 7-13% のアセトニトリルで溶出した。この溶出液は 260nm の紫外吸収でモニターし、適切なフラク

いる。

1. プライマーの合成

次の 2 つのオリゴデオキシリボヌクレオチドプライマーを下記する方法を用いて調製した。

5' CACAGGGCAGTAACG 3' プライマー A、及び
5' TTGCTTCTGACACA 3' プライマー B

オートメーション化された合成法

ビューケージとカルサース法 (Tetrahedron Letters 22 巻 1859-1862 頁 (1981 年)) に従って合成したジエチルフォスフロアミダイトを、バイオサーチ SAM-1 を使用して制御した多孔ガラス担体から誘導したヌクレオシドへ次々と濃縮した。この方法は、ジクロロメタン中でのトリクロル酢酸による脱トリチル化と活性のある水素供与体としてベンゾトリアゾールを使用する縮合、及びテトラハイドロフラン及びビリジン中での無水酢酸とジメチルアミノビリジンによるカップリングを含んでいた。1 サイクルの時間は約 30 分であった。各ステップの収率は実質的に当量的で

ションを集め、固定した量での紫外吸収で定量分析し、かつ室温下で減圧遠心機中で蒸発させ乾燥した。

オリゴデオキシリボヌクレオチドの特徴付け

精製したオリゴヌクレオチドのテスト溶液をポリヌクレオチドキナーゼ及び γ -³²P-ATP で ³²P ラベルした。このラベルした化合物を 50 ボルト/cm で 45 分間電気泳動にかけた後、14-20% のポリアクリルアミドゲルのオートラジオグラフィーで確認した。この方法では分子量を確認することができる。ヘビ毒ジェステラーゼと細菌性アルカリフォスファターゼを使用してオリゴデオキシリボヌクレオチドをヌクレオシドに消化し、そして次に、逆相 HPLC カラム、並びに 10% アクリロニトリル及び 1% 酢酸アンモニウム移動相を使用して、誘導されたヌクレオシドを分離し定量することにより塩基組成を決定した。

以下余白

II. DNA源

A. 全ヒト野性型DNAの抽出

正常の β -グロビンのヒトゲノムDNAホモ接合体を、ステットラーによりProc. Nat. Acad. Sci.の72巻5966-5970頁に記載された技術を用いてセルラインMolt 4 (ヒューマン・ジェネティック・ミュータント・セル・レポジトリから入手し、GM2219cと同定した) から抽出した。

B. クローン化したグロビン遺伝子の造成

正常の β -グロビン遺伝子の1.9 kbのBam HI断片をコスミドpFC11 から分離し、pBA322のBam HI部位に挿入した(ソベロンらのGene 9巻287-305頁(1980年))。合成40塩基対プローブとハイブリダイズする領域を含むこの断片は、第1及び第2のエクソン、第2のイントロン、並びに遺伝子の5'のフランキング(flancking)配列を含む(ローンらのCell 11巻1157-1174頁)。このクローンはpBR328:HbAと名付けられ、ATCC第39,698号として1984年5月25日に寄託された。

III. ポリメラーゼの連鎖反応

60 mM酢酸ナトリウム、30 mMトリスーセテート及び10 mM酢酸マグネシウムを含むpH 8.0の緩衝液100 μ lへ100ピコモルのプライマーA(d(CACAGGGCACTAACG)の配列)、100ピコモルのプライマーB(d(TTTGCTTCTGACACA)の配列)及び1000ピコモルのデオキシATP、デオキシCTP、デオキシGTP及びTTPを含む2 μ lの溶液を加えた。更に上述した、下記のDNA源の1つを加えた。

- 10 μ gの全ヒト野性型DNA (反応I)
- 0.1ピコモルのpBR328:HbA (反応II)
- 0.1ピコモルのpBR328:HbS (反応III)
- 0.1ピコモルのpBR328:HbA/MstII (反応IV)
- 0.1ピコモルのpBR328:HbB/MstII (反応V)
- 非標的DNA (反応VI)

得られる各溶液を100℃で4分間加熱し2分間で室温まで冷却し、その後E. コーリーDNAポリメラーゼのクローン断片の4単位を含む1 μ l

β -グロビンの鎌状赤血球貧血対立遺伝子の対応する1.9 kbのBam HI断片はコスミドpF12から分離され、上述の通りクローン化された。このクローンはpBR328:HbSと名付けられ、ATCC第39,699号として1984年5月25日に寄託された。

各組み換えプラスミドをE. コーリーMM294(ATCC第39,607号)へ形質変換し、そして増殖せしめた。

C. クローン化されたグロビン遺伝子のMst IIによる消化

それぞれの全量が100 μ gであるpBR328:HbAとpBR328:HbSを単独で20単位のMst II(ニューイングランドバイオラブ社)とともに16時間37℃で、150 mMNaCl、12 mMのTris HCl(pH 7.5)、12 mMのMgCl₂、1 mMのジチオスレイトール(DTT)及び100 μ g/mlのウシ血清アルブミン(BSA)中で消化した。生成物はそれぞれpBR328:HbA/Mst II及びpBR328:HbS/Mst IIと名付ける。

を加えた。各反応は10分間行い、その後プライマー、ヌクレオチド及びDNAを加え、加熱し、冷却し、ポリメラーゼを加え、そして反応させるサイクルを反応Iについては19回、反応II-VIについては4回繰り返した。

第1サイクルの前及び各反応の最後のサイクルの後で取り出された反応I及びIIのアリコート4マイクロリットルを、pH 8.3の0.089Mトリス硼酸塩緩衝液中で、2.5 mM EDTA中で、12%ポリアクリルアミドゲルに加えた。このゲルを25ボルト/cm、4時間電気泳動させ、固相担体として機能するナイロン膜へ移し、そして、pH 7.4で30%のフォルムアミド、3xSSPE、5xデンハルト及び5%のドデシル硫酸ナトリウム中で、標準的技術を用いて調製した次式:
5'-d(TCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTACTGCCCTGTGGGCAAG) 3'の³²Pでラベルされた40塩基対の合成断片で検知した。第2図は、反応I及びII用の検知されたナイロン膜のオートラジオグラフである。レーン1は0.1ピコモルの58塩基対の対照合成断片で、

そのうちの1つの鎖は上記プローブと相補的である。レーン2は第1の増幅サイクルの前の4 μ lの反応1の液である。レーン3は20回の増幅サイクル後の4 μ lの反応1の液である。レーン4は5回の増幅サイクル後の4 μ lの反応IIの液である。レーン5は α -³²P-デオキシNTP及びポリメラーゼでラベルされたpBR322(ニューイングランドバイオラブ社)のFokI(ニューイングランドバイオラブ社)から成る分子量標準である。レーン3は、20サイクル後反応混合物Iは適切な分子量を有する特定の配列を大量に含み、他の検出できる生成物がないことを示している。5サイクル後の反応混合物IIもレーン4に示す通り出発物質である核酸と他の生成物の他にこの生成物も含んでいる。

5サイクル後の反応IIからVIの液5.0 μ lに上述の各プライマー5ピコモルを加えた。溶液を4分間100℃に加熱し室温へ戻した。それぞれ3ピコモルの α -³²P-デオキシATP、 α -³²P-デオキシCTP、 α -³²P-デオキシGTP及び α -

-³²P-TTP、並びに4単位のクレノー断片を加えた。最終的な容積が10 μ lであり塩濃度が上記した通りである反応を10分間行わせた。ポリメラーゼ活性は60℃で20分間加熱すると失われた。反応II-VIの反応液4 μ lを、0.089Mトリス酢酸塩緩衝液、2.5mMEDTA中で12%ポリアクリルアミドゲルに加えた。このゲルを25ボルト/cm、4時間電気泳動させ、その後オートラジオグラフ処理した。

第3図は、電気泳動のオートラジオグラフである。レーン1は分子量標準、レーン2は反応II、レーン3は反応III、レーン4は反応IV及びレーン5は反応Vである。対照としてのDNAを伴わない反応VIのレーンはレーンのどこにもイメージを有さない。図から、標的DNAから予想される94塩基対断片は、無傷の β -グロブリンDNA配列が増幅用に使用できるときのみ存在できることが分かる(つまりレーン2のpBR328:HbA、レーン3のpBR328:HbS及びレーン5のpBR328:HbS/MstII)。MstIIによる消化はpBR328:HbA

を94塩基対配列中で切断し、それを増幅できないようにし、94塩基対のバンドはレーン4に現れない。これに対し、pBR328:HbSの94塩基対配列はプラスミドがMstIIで消化されても切断せず、従って第5図に示すように増幅に利用できる。

第4図は94塩基対配列を増幅する3サイクルの連鎖反応を示すものである。PC01とPC02はプライマーA及びBである。右の数はサイクルを示し、左の数は特定の分子が生産されたサイクル数を示す。

実施例3

本実施例は、ヒトヘモグロビン遺伝子中の対立遺伝子MstII部位を含む110塩基対配列の増幅を示すものである。

プライマーは実施例2の技術で調製されたものである。1.0マイクログラムの全ヒトDNA、100ピコモルのd(ACACAACGTGTTCAGC)及び100ピコモルのd(CAACTTCATCCACGTTACCC)を以下のような100 μ lの溶液に溶解させた。

1.5mM各4つのデオキシリボスクレオシド三リン酸

30mM pH7.9のトリスアセテート緩衝液

60mM酢酸ナトリウム

10mM酢酸マグネシウム

25mMジチオスレイトール

この溶液を100℃で1分間加熱し、迅速に25℃に下げて1分間加熱し、その後DNAポリメラーゼのクレノー断片2.5単位を加えた。ポリメラーゼの反応が25℃で2分間行い、その後加熱、冷却、クレノー断片の添加及び反応を望むだけ繰り返した。

各サイクルの効率が70℃で、15サイクル行なって、 β -グロブリン遺伝子の所望の110塩基対断片1.4フェトモルを合成した。

実施例4

本実施例は、ヒトヘモグロビン遺伝子の対立遺伝子中のMstII部位を含む240塩基対配列の増幅

を示すものである。この配列は、Nco I、Hinf I 及び Mst II 制限部位を含んでいる。

pHが8.0で、60mM酢酸ナトリウム、30mMトリスアセテート及び10mM酢酸マグネシウムの混合物(0.1ピコモルのpBR328:HbAを含む)に、

100ピコモルのd(GGTTGGCCAATCTACTCCAGG)プライマー、
100ピコモルのd(TAACCTTGATACCAACCTGCC)プライマー、
各1000ピコモルのデオキシATP、デオキシCTP、
デオキシGTP及びTTP
を含む2μℓの溶液Aを加えた。

2つのプライマーは実施例2に記載した技術で調製した。溶液を100℃で4分間加熱し、空気中で2分間冷却し、その後E. コーリーDNAポリメラーゼのクレノー断片4単位を含む液1μℓを加えた。反応を10分間進行させ、その後溶液Aの添加、加熱、冷却、ポリメラーゼの添加及び反応からなるサイクルを3回繰り返した。反応液5.0μℓに、上記の各オリゴヌクレオチドプライマー5ピコモルを加えた。溶液を100℃で4分間

加熱し、室温まで下げ、その後それぞれ3ピコモルのα-³²P-ラベルされたデオキシリボヌクレオシド三リン酸及び4単位のクレノー断片を加えた。最終的な容量が10μℓで塩濃度が上記の通りである反応を10分間進行させる。ポリメラーゼ活性は60℃で20分間加熱すると失活した。2μℓのアリコートにNco I、Hinf I 及び Mst II で消化し、pH8.3の0.089Mトリスアセテート緩衝液、0.25mMEDTA中で12%ポリアクリルアミドゲルに加えた。ゲルを25ボルト/cmで4時間電気泳動させ、オートラジオグラフ処理した。第5図は電気泳動のオートラジオグラフを示し、ここでレーン1は分子量標準、レーン2は酵素の消化を伴わないもの(無傷の240塩基対)、レーン3はNco Iによる消化(131及び109塩基対)、レーン4はMst IIによる消化(149及び91塩基対)、そしてレーン5はHinf Iによる消化(144及び96塩基対)である。オートラジオグラフは240塩基対反応の増幅したものと一致する。
以下示す

実施例5

本実施例は、逐次的消化による鎌状赤血球貧血を検出するための本発明の方法の使用を示すものである。

オリゴデオキシリボヌクレオチドの合成及びリン酸化

5'-CTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGG 3'の配列のラベルされたDNAプローブ(*がラベルを意味する)RS06、及びRS06と3つの塩基対がミスマッチしている

3'-GACAGAGGTACCTCTTCAGACGGCAATGACGGGACACCC 5'の配列のラベルされていないブロックオリゴマーRS10を、実施例2(1)の方法に従って合成した。プローブRS06は、その5ピコモルを、70mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mM MgCl₂、1.5mMスベルミン及び2.5mMジチオスレートを含む反応容量40μℓ中の4単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼ(ニューイングランドバイオラブ社)及び50ピコモルのγ-

³²P-ATP(ニューイングランドニュークレア社、約7200Ci/ミリモル)と接触させることによりラベルした。全容量を25mMEDTAで100μℓに調節し、トリス-EDTA(TE)緩衝液(10mMトリス緩衝液、0.1mMEDTA、pH8.0)により平衡化されたバイオラッド製の1mlのBio Gel P-4スピン透析カラム上でマニアティスらがMolecular Cloning 464-465頁(1982年)に記載している方法に従って精製した。ラベルされたプローブは、トリス-硼酸-EDTA(TBE)緩衝液(89mMトリス、89mM硼酸、2.5mMEDTA、pH8.3)中18%のポリアクリルアミドゲル(19:1のアクリルアミド:BISとバイオラッド)上で500vhrにて電気泳動してさらに精製した。オートラジオグラフによる位置きめの後、ラベルされたプローブを含む部分を切り取り、粉碎し、0.2mlのTE緩衝液中へ一晩かけて4℃で溶出させた。反応生成物のTCA沈殿は比活性が4.9Ci/ミリモルであり、最終的濃度が20ピコモル/mlであることを示し

ている。

ラベルされないRS10ブロッキングオリゴマーは200ピコモル/mlの濃度で使用した。

細胞系からのヒトゲノムDNAの分離

実質的にステットラーらのPNAS 79巻5966-5970頁(1982年、Molt 4について)に記載の方法及びマニアティスらのMolecular Cloning 280-281頁(1982年)に記載の方法を使用して、Molt 4、SC-1及びGM2064のリンパ球系から高分子のゲノムDNAを分離した。

Molt 4 (ヒューマン・ミュータント・セル・デポジットリー、GM2219C)は正常の β -グロビンについてホモ接合体のT細胞系であり、そしてATCCに1985年3月19日に寄託されたSC-1は鎌状赤血球貧血対立遺伝子についてホモ接合体のEBVで形質変換されたB細胞系である。GM2064 (ヒューマン・ミュータント・セル・デポジットリー、GM2064)は胎児ヘモグロビンの遺伝的な永続性(HPFH)についてホモ接合体である個体当

初単離され、 β -又は δ -グロビン遺伝子配列を含んでいない。全ての細胞系は10%の牛胎児血清を含むRPMI-1640中に維持された。

臨床血液試料からのヒトゲノムDNAの単離

既知の鎌状細胞キャリアー(AS)からのCH12と名付けられた臨床血液試料をカルフォルニア州オークランドの小児病院のベルトラム・ルビン博士から得た。ヌンベルグらのProc. Nat. Acad. Sci. 75巻5553-5556頁(1978年)に記載されている方法の変法を使用して、主に末梢の血液リンパ球から成るパフィーコート部分からゲノムDNAを調製した。

細胞を、5mlのトリス-EDTA-NaCl (TEN)緩衝液(pH 8の10 mMトリス、pH 8、1 mM EDTA、10 mM NaCl)中に再懸濁し、0.2 mg/mlのプロテイナーゼ、0.5%のSDSに調節し、そして37℃で一晩インキュベートした。過塩素酸ナトリウムを0.7 Mに加え、そして細胞溶解物を室温で1-2時間穏やかに振とうした。

細胞溶解物をフェノールとクロロホルムの1:1混合物30 mlで抽出し、続いてクロロホルム30 mlで抽出し、次にエタノールで核酸を沈澱させた。ペレットを2 mlのTE緩衝液に再懸濁させ、RNaaseを0.005 mg/mlに加えた。37℃で1時間消化させた後、DNAを同量のフェノール、フェノール/クロロホルム、及びクロロホルムでそれぞれ一度ずつ抽出し、エタノールで沈澱させた。DNAを0.5 mlのTE緩衝液に再懸濁させ、260 nmの吸収により濃度を決定した。

β -グロビン配列を選択的に増幅するためのポリメラーゼ連鎖反応

2 マイクログラムのゲノムDNAを、10 mM トリス緩衝液(pH 7.5)、50 mM NaCl、10 mM MgCl₂、150ピコモルの配列d(CACAGGGCACTAACG)のプライマーA、及び配列d(CTTTGCTTCTGACACA)のプライマーBを含む反応容量100 μ lの当初溶液中で増幅し、かつ蒸発を防ぐため約100 μ l厚の鉱油で被覆した。

各DNA試料につき、1サイクルが次の3ステップから成る増幅のための15サイクルを行った。

(1) 2分間95℃で熱ブロックセット中で変性する。

(2) 熱ブロックセットを直ちに30℃に移し2分間プライマーとゲノムDNAがアニーリングするようにする。

(3) E. コーリーDNAポリメラーゼIのクレノー断片(ニューイングランドバイオラブ)5単位とデオキシATP、デオキシCTP、デオキシGTP及びTTPそれぞれ1ナノモルを含む2 μ lの溶液(10 mM トリス(pH 7.5)、50 mM NaCl、10 mM MgCl₂、及び4 mM ジチオスレイトールから成る緩衝液中)を加える。この伸長反応を30℃にて10分間行った。

最後のサイクルの後、95℃にて2分間維持して反応を停止させた。鉱油は0.2 mlのクロロホルムで抽出して廃棄した。最後の反応液の容量は130 μ lであった。

以下余白

プローブ及びDde I /Hinf I による増幅したゲノムDNAのハイブリダイゼーション/消化

25マイクロリットルの増幅されたゲノムDNAをエタノールで沈澱させ、同量のTE緩衝液中に再懸濁した。10マイクロリットル(154ngのゲノムDNAと同等の前増幅体を含む)を1.5mlのマイクロフュージ管に入れ、そして20μlのTE緩衝液により最後の容量を30μlとした。試料を鉱油で被覆して95℃で10分間変性した。ラベルされたRS06プローブ0.02ピコモルを含む0.6MNaCl10マイクロリットルを管に加え、穏やかに混合し、直ちに56℃の熱ブロックに移して1時間おいた。ラベルしていないRS10ブロッキングオリゴマー4マイクロリットル(0.8ピコモル)を加え、更に10分間同じ温度でハイブリダイゼーションを続けた。5マイクロリットルの60mMMgCl₂/0.1%BSA及び1μlのDde I (10単位、ニューイングランドバイオラブ)を加え、再アニーリングされたDNAを56℃で30分間消化した。1マイクロリットルの

Hinf I (10単位、ニューイングランドバイオラブ)を加え、更に30分インキュベートした。4μlの75mMEDTAと6μlのトラッキング染料を最終容積が61μlになるように反応混合物に加えて反応を終了した。

鉱油を0.2mlのクロロフォルムで抽出し、18μlの反応混合物(45ngのゲノムDNA)をヘファーSE200装置中の30%ポリアクリルアミドのミニゲル(19:1、バイオラド)に負荷した。このゲルをブロモフェノールブルー染料の前端が当初の位置から3.0cm動くまで約300ボルトで1時間電気泳動させた。該ゲルの前端の1.5cmは取り除かれ、残りのゲルは4日間-70℃で強化スクリーンに曝される。

写真の検討(第9図)

各レーンは45ngの増幅されたゲノムDNAを含んでいる。レーンAはMolt4 DNAを、レーンBはCH12を、レーンCはSC-1を、又レーンDはGM2064を含んでいる。Molt4は、細胞当たり2

コピーのβ^A遺伝子を有する正常の個体の遺伝子型CAAであり、CH12は、細胞当たり1個のβ^Aと1個のβ^S遺伝子を有する鎌状細胞キャリアからの臨床用試料(AS)であり、そしてSC-1は細胞当たり2コピーのβ^Sを有する鎌状血球貧血個体の遺伝子型を意味する。GM2064はβ⁻又はδ-グロビン配列を含有せず、ネガティブ対照として存在する。

写真から分かるようにDde Iで開裂された、β^A特異的であるオクタマーはβ^A遺伝子を含むDNAにのみ存在し(レーンA及びB)、Hinf Iで開裂された、β^S特異性を有するトリマーは、β^S遺伝子を含むDNAにのみ存在する(レーンB及びC)。トリマー及びオクタマーの両者の存在(レーンB)は鎌状赤血球貧血キャリアを示すものであり、オクタマーのみを生ずる正常の個体(レーンA)及びトリマーのみを示す鎌状赤血球貧血にかかっている個体(レーンC)から区別される。

比較のため、上記実験を増幅されていないゲノ

ムDNAを用いて繰り返し行い、増幅を行うと検出感度が少なくとも1000倍増加することが分かった。

実施例6

本実施例は、ラベルされたプローブを使用することなく全ヒトDNA中の全く精製されていない単一コピー遺伝子をゲル上で直接検出する方法を示すものである。

実施例3に記載した技術を用い、β-グロブリン遺伝子の第1エクソン中の配列からの110塩基対断片を、全ヒトDNA10マイクログラムから20サイクルで増幅した。この20サイクル後に生産される110塩基対断片は、臭化エチジウムにより容易に染色されてゲル上で見ることができた。

配列は、最初に制限酵素Dde Iにより切断されると、配列がβ-グロビンのS対立遺伝子中における場合のように酵素により認識される制限部位を含まないものでない限り、増幅されなかった。

実施例 7

A. ヒト β -グロビン A 対立遺伝子からの 1.9 kb 挿入部を含む合計 100 フェムトモルの pBR328、500 Ci/mol である各 α -³²P-デオキシ NTP を 50 ナノモルずつ、及び実施例 3 で使用した各プライマー 1 ナノモルを、100 μ l の 30 mM トリス-アセテート (pH 7.9)、60 mM 酢酸ナトリウム、100 mM ジチオスレイトール及び 10 mM 酢酸マグネシウムを含む溶液中に溶かした。この溶液を 100℃ にして 2 分加熱し、25℃ にて 1 分冷却した。4.5 単位の E. コーリー DNA ポリメラーゼ I 及び 0.09 単位の無機ピロフォスファターゼを加えて反応混合物中でピロリン酸が生ずるのを防止し、その後反応を 25℃ で 2 分間進行させ、更に加熱、冷却、酵素の添加及び反応のサイクルを 9 回繰り返した。各合成サイクルの後、10 μ l のアリコートを取り出し 1 μ l の 600 mM EDTA に加えた。それぞれを、90 mM のトリスボレート及び 2.5 mM EDTA 中、pH 8.3 で 14% のポリアクリルアミドゲル

上で 24 ボルト/cm、2.5 時間で分析した。

操作の終了したゲルは、0.5 μ g/ml の臭化エチジウムを加えた同じ緩衝液に 20 分浸し、当初の緩衝液で洗浄し、赤フィルターを用いて紫外線中で写真を撮影した。

生産された 110 塩基対断片は紫外線でゲルから切り出し、そしてクレンコフ放射により計数した。N がサイクル数を意味し、y がサイクル毎の部分的収率である式

$$\text{pmoles}/10 \mu\text{l} = 0.01((1+y)^N - yN - 1),$$

にデータを一致させようとする試みは、y が 0.619 であるときに楽観的なものとなる。これは、十分な増幅が起こっていることを暗示している。

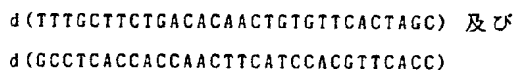
B. 各デオキシ NTP を 100 ナノモルずつ 100 μ l の反応溶液に加え、放射性ラベルを行わず、各サイクル毎に液を取り出さなかった以外は、上記実験を繰り返した。10 サイクル後に反応物を 2 分間沸騰させて反応を停止させ、57℃、1 時間で再ハイブリダイゼーションを行った。110 塩基対生成物の配列を、その 8 μ l のアリコートを、

1 μ l のウシ血清アルブミン (25 mg/ml) と 1 μ l の好適な制限酵素 (HinfI、MnlI、MstII、NcoI) を加えて制限分析し、37℃ で 15 時間反応させて確認した。PAGE は、上述の通り行った。

実施例 8

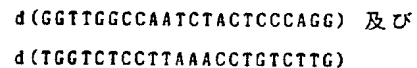
本実施例は、pBR328 と pBR322 の種々の断片を増幅するために異なったプライマーを使用する例を示す。

A. 次のプライマーを使い pBR328 の 130 塩基対断片を調製すること以外は実施例 7 A と同じように実験を繰り返した。

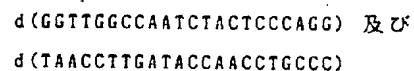


B. 次のプライマーを用いたこと以外は実施例 7 A と同じように実験を繰り返し pBR328 の 262 塩基対断片を調製した。反応時間はサイクル当たり 20 分であった。

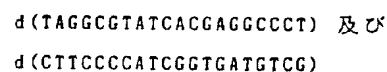
以下余白



C. ヒト β -グロビン S 対立遺伝子からの 1.9 kb の挿入部を含む 100 フェムトモルの pBR328 の MstII 消化物を当初の鑄型として用いた以外は、実施例 8 B と同様に実験を行った。該プラスミドは MstII により数回切断されたが、増幅すべき配列の内側では切断が起こらなかった。更に、使用したプライマーは次の通りで、240 塩基対断片を生産した。



D. 100 フェムトモルの pBR322 の NruI 消化物を鑄型として用い、100 μ l の反応液中で各デオキシ NTP を 200 ナノモル使用し、次のプライマーを使用して pBR322 から 500 塩基対断片を生産した以外は実施例 7 B と同様に実験を行った。



反応時間は 37℃ でサイクル当たり 20 分であっ

た。最後の再ハイブリダイゼーションは57℃で15時間行った。電気泳動は4%アガロースゲル上で行った。

実施例9

本実施例は、インビトロ変異が増幅されたセグメントに導入されるような本発明方法を例示するものである。

A. NruIで直線化したpBR322合計100フェムトモル、1ナノモルの75塩基対断片を生成するように設計されたそれぞれ次式

d(CGCATTAAAGCTTATCGATG) 及び

d(TAGGCGTATCAGGAGGCCCT)

のプライマー、それぞれ100ナノモルの各デオキシNTPを、pH8の40mMトリス、20mM MgCl₂、5mMジチオスレイトール及び5mg/mlのウシ血清アルブミンの溶液100μl中で混合した。この混合物を100℃にして1分間加熱し、水浴中23℃、0.5分間冷却し、次に4.5単位のクレノー断片と0.09単位の無機ピロフォスファター

T7プロモーターはRNA転写を開始させるために使用できる。T7ポリメラーゼを101塩基対断片に加えて単鎖RNAを生成せしめることができる。

C. オリゴヌクレオチドプライマーとして下記のものを使用して、pBR322から1000塩基対断片を調製した以外は実施例8Dと同様に実験を繰り返した。

d(TAGGCGTATCAGGAGGCCCT) 及び

d(CCAGCAAGACGTAGCCCAGC)

D. 上記9Cと同様の実験を繰り返した。但し、オリゴヌクレオチドプライマーとして下記のもの、

d(TAGGCGTATCAGGAGGCCCT) 及び

d(AATTAATACGACTCACTATAGGGAGATAGGCGTATCAGGAGGCCCT)

を使用して1026対断片を調製した。2番目のプライマーの26ヌクレオチドはpBR322には存在せず、上記のT7プロモーターを示すものである。このプロモーターは、pBR322からの1000塩基対断片に隣接して挿入された。

これらの結果は、鋳型鎖と完全にマッチしてい

ぜを加え、反応を3分間行った。加熱、冷却、酵素添加及び反応のサイクルを9回繰り返した。

10回目の反応サイクルは凍結により終了させ、反応混合物のアリコート8μlを4%アガロースゲルに適用し、臭化エチジウムにより視覚化した。

B. オリゴヌクレオチドプライマーとして次式のものを使用した以外は実施例9Aと同様の実験を繰り返した。

d(CGCATTAAAGCTTATCGATG) 及び

d(AATTAATACGACTCACTATAGGGAGATAGGCGTATCAGGAGGCCCT)

これらのプライマーは101塩基対を生産するように設計され、その(2番目のプライマー中の)

26ヌクレオチドはpBR322には存在しない。これらのヌクレオチドはT7プロモーターの配列を表すもので、これを、pBR322からの75塩基対配列に、20の相補的塩基と26塩基の5'側伸長部とを有するプライマーを使用して連結した。この方法は2時間より少ない時間で実施することができ、

100フェムトモルのpBR322から比較的純粋な101塩基対断片2ピコモルを生産することができた。

ないがそれにもかかわらず十分にハイブリダイズして酵素的に伸長するプライマーは、当初の鋳型に対応する鎖よりむしろプライマーの鎖を含む長鎖生成物を生成せしめるということを暗示する。長鎖生成物はインビトロ変異を生じさせる第2のプライマー用の鋳型としての役割を果たす。その後のサイクルでは、更に多くのミスベアしたプライミングが要求されないの、効率が減少することなくこの変異は増幅される。この場合、その5'末端に相補的でない伸長部分があるプライマーが、複製されるべき鋳型に隣接して生成物中に新しい配列を挿入するために使用された。

実施例10

本実施例は単コピー遺伝子を増幅させる際にバックグラウンドを減少させるためにネスト状に(nested)セットしたプライマーを使用することを例示するものである。

野生型β-グロビン対立遺伝子についてホモ接合体である全ヒトDNAに対して、20サイクル

の増幅を次のように行った。10 μ g の DNA、それぞれ 200ピコモルの次式のプライマー、

d(ACACAACGTGTTCCTAGC) 及び

d(CAACTTCATCCACGTTCC)

並びに 100ナノモルずつの dNTP を、100 μ l の 30 mM トリス-アセテート、60 mM 酢酸ナトリウム、10 mM ジチオスレイトール、及び 10 mM 酢酸マグネシウム中で 100℃ にて 1 分間加熱し、25℃ に 1 分間下げて、そして 2 単位のクレノー断片とともに 2 分間処理した。加熱、冷却、クレノー試薬の添加のサイクルを 19 回繰り返した。10 μ l の液体を反応混合物から取り出し、更に 10 回の増幅のためのサイクルを次の各プライマーを用いて行った。

d(CAGACACCATGGTGCACCTGACTCCTG) 及び

d(CCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTCC)

これらは、上記で生産された 110塩基対断片中に含まれる 58塩基対断片を増幅した。増幅すべき最後の 10 回のサイクルは、10 μ l のアリコート、上記した各デオキシ NTP 100ナノモルと

各プライマー 200ピコモルを含む 90 μ l の新しいトリス-アセテート緩衝液に希釈することにより達成することができた。反応条件は上記の通りとした。10 サイクルの後 10 μ l のアリコート（当初の DNA の 100ナノグラムに対応）を 6% の Nu シーブ（FMC 社）アガロースゲルに加え、臭化エチジウムを使って視覚化した。

第 10 図は、紫外線で発光させた従来法の通り赤いフィルターを通して写真撮影した上記ゲルを示すものである。レーン 1 は分子量のマーカーである。レーン 2 は上記反応のアリコートである。レーン 3 は当初の野性型 DNA が増幅の前に DdeI により開裂されたこと以外は上記したものと同じ反応のアリコートである。レーン 4 は鎌状赤血球貧血 β -グロビン対立遺伝子についてホモ接合体であるヒト DNA を増幅の前に DdeI で処理したこと以外は上記と同様な反応のアリコートである（鎌状赤血球貧血対立遺伝子は増幅される断片内に DdeI 部位を含まない）。レーン 5 は蛙の精子 DNA でヒト DNA を置き換えた以外は上記と同

様の反応のアリコートである。レーン 6 は増幅後反応液を DdeI で処理したこと以外は上記と同様な反応のアリコートである（DdeI は 58塩基対の野性型生成物を 27塩基対及び 34塩基対の断片に変換する）。レーン 7 は増幅後 DdeI で処理したレーン 4 の材料のアリコートである（58塩基対の鎌状赤血球貧血生成物は DdeI を含まない）。

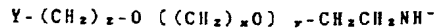
アガラーセゲルの臭化エチジウム染色のみを使用してヒト DNA の 1 マイクログラムからの単コピー遺伝子を代表する 58塩基対断片を検出するためには、約 500,000 倍に増幅することが必要である。これは、ここで 2 つのオリゴヌクレオチドのネスト状セットを使用して達成することができる。第 1 のセットは 110塩基対断片を増幅し、そして内部のネスト状セットは、第 10 図に示すように便利に検出できるレベルになるまでこの生成物のサブ断片を増幅する。先行する増幅工程で増幅された配列中に含まれ、又他のプライマーの伸長生成物中にも含まれるより小さな配列をプライマーを使って増幅する本法は、例えばコナーら

の PNAS 80 巻 278 頁（1983 年）及びレアラーの PNAS 80 巻 4045 頁（1983 年）に記載されているように放射性同位体又は非放射性同位体プローブのハイブリダイゼーションの方法論に頼ることなく、 β -グロビンの座における野性型を鎌状赤血球貧血対立遺伝子から区別することを可能にする。

実施例 1.1

本法は、患者の DNA 試料中の例えばクラミジアのような伝染性疾患と関連する特定の配列を、所望の増幅された配列を含むビオチン化されたハイブリダイゼーションプローブを使用しかつ前述の米国特許第 4,358,535 号に記載された方法を使用して検出する際に有用であることが期待される。ビオチン化されたハイブリダイゼーションプローブは、一部が二重鎖となった DNA に、次式のスベアームを介してビオチンに結合した 4'-メチレン置換-4, 5'-8-トリメチルブソラレンを挿入しかつ光を照射することにより調製する

ことができる。



式中Yは、O、NH又はN-CHO、xは1から4までの数、そしてyは2から4までの数である。プローブ上のビオチニル基の検出には、エンゾバイオケム社により市販されているストレプトビジン-酸性フォスファターゼ複合体を用いて、パンフレットに製造者が示している検出方法により達成することができる。ハイブリダイゼーションプローブは、検出用複合体との結合、及びそれに続く酸性ホスファターゼにより触媒される反応（この反応が沈澱性色素を生成する）に基づく沈澱した染色スポットとして見るることができる。

実施例 1.2

本実施例では、実施例7の方法を基本的には使用し、ヒトβ-グロビン遺伝子上の119塩基対断片を次のプライマーを使用して増幅させた。

5'-CTTCTGcagCAACTGTGTTCACTAGC- 3' (GH18)

5'-CACaAgCTTCATCCACGTTTACC- 3' (GH19)

ここで小文字は野性型配列とミスマッチし、制限酵素部位を生成する。全スキームは表1に示してある。表1はヒトβ-グロビン遺伝子の119塩基対断片をクローン化しかつ配列決定するために使用され、又内部制限部位を含むよう設計されているプライマーGH18及びGH19を図解したものである。出発コドンATGにはアンダーラインが引かれている。GH18は、負鎖と相補的な26塩基対のオリゴヌクレオチドでかつ内部にPst I部位を有している。GH19は正鎖に相補的である23塩基対のオリゴヌクレオチドであり、内部にHind III 認識部位を含んでいる。矢印は、DNAポリメラーゼIによる伸長方向を示す。四角で囲った配列は各プライマーの制限酵素認識配列を示す。これらのプライマーは、バクテリオファージM13のPst IとHind III 制限部位に対して相同である遺伝子領域を第1にスクリーニングして選択された。次に、プライマーは先行する実施例で記載した通りに調製された。

以下余白

TABLE I

		GH19
		Ddel
		CCACTTGCACCTACCTTCACAC
CTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTTGATGAAGTTGGTG(+)		
GAAGACTGTGTTGACACAAGTGATCGTTGGAGTTTGTCTGTGGTACCACGTGGACTGAGGACTCCTCTTCAGACGGCAATGACGGGACACCCCGTTCCACTTGCACCTACTTCAACCAC(-)		
CTTCTGCAACCTGTGTTCACTAGC	→	
		GH18
		Pst I
5' CTTCTGCAACCTGTGTTCACTAGC 3' GH18	左リンカープライマー	
5' CAGCACTTCATCCACGTTTACC 3' GH19	右リンカープライマー	
		Hind III

以下余白

増幅及びクローニング

実施例2で述べたように細胞系Molt 4から単離した1マイクログラムのヒトゲノムDNAの増幅を20サイクル行った後、反応生成物の14分の1を、ラベルした β -グロビンに特異的であり、その配列が、5'-CTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTA-CTGCCCTGTGGG-3'であるオリゴヌクレオチドプローブRS06に上述のオリゴマー制限法を用いてハイブリダイズさせた。溶液ハイブリダイゼーションの後、反応混合物を上述した制限消化条件下でDde Iにより処理して8塩基対オリゴヌクレオチドを生成せしめた。この8塩基対の生成物の量は、増幅され生成された生成物の量に比例する。この消化生成物は30%のポリアクリルアミドゲル上で分離し、オートラジオグラフィで視覚化した。

オートラジオグラムを分析した結果、該増幅は野生型 β -グロビン遺伝子の正鎖及び負鎖のそれぞれと相補的であるプライマーPC03 (5'-AC-ACAACTGTGTTCAGTACC-3') 及びPC04 (5'-CC-

ルターを、 β -グロビンに特異的な、配列が5'-CCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTCCTCAGGAGTCAG-3'であるオリゴヌクレオチドプローブRS24により検知して、 β -グロビン挿入部の数を決定した。フィルターはプライマーPC04で再度標識され、全挿入数を決定した。

ブレーティング及びスクリーニング

表IIは、ブレーティングとブラックハイブリダイゼーションのデータを纏めたものである。フィルターをプライマーPC04で検知し、増幅とクローニングに起因する挿入部のパーセントを決定した。1206個のクリアーなブラック（クリアーなブラックの全数の90%）がプライマーにハイブリダイズした。15のブラックが β -グロビンに特異的なブラックRS04にハイブリダイズした。増幅されたプライマーに陽性なブラックのうち β -グロビンに陽性なブラックは約1%である。

以下余白

-ACTTGACCTACTTCAAC-3') による増幅と増幅効率において匹敵するものであることが分かった。

増幅された生成物はエタノールで沈澱して脱塩しそして濃縮し、そしてサンプルを10mMトリス、10mMMgCl₂、1mMDTT、100mM NaClから成る制限緩衝液(pH8)に再溶解し、Pst I及びHindIIIで同時に消化した。その消化後、試料をセントリコン10濃縮装置で脱塩し、ベーリンガー・マンハイム社から入手できるPst I/HindIIIで消化されたベクターM13mp10wの0.3マイクログラムと、12℃で一晩連結した。

全部の結合混合物がメリーランド州ベテスタのBRLから入手できるE. コーリー株JM103へ形質転換された。形質転換株を調製するための方法は、A. ワルトンによりMessing, J. Third Cleveland Symposium on Macromolecules: Recombinant DNA 143-153 頁に記載されている。

形質転換混合物を、ナイロンフィルターを用いるブラックハイブリダイゼーションによるスクリーニングのため、x-ゲル培地上に移した。フィ

TABLE II

プレート No.	青 ブ ラ ッ ク	挿入部 なし*	挿入部 あり**	β -グロビン 挿入部有り
1	28	25	246	1
2	29	18	222	2
3	11	26	180	0
4	24	20	192	5
5	22	27	185	5
6	39	21	181	3
合計	158	132	1206	15

増幅された配列を含有するブラックに対する β -グロビン挿入部を含有するブラックの% = $15 / 1206 \times 100 = 1.24\%$ 。

全ブラックに対する β -グロビン挿入部を含有するブラックの% = $15 / 1496 \times 100 = \text{約} 1\%$ 。

全ブラックに対する増幅された配列を含有するブラックの% = $1206 / 1496 \times 100 = 80\%$ 。

* プライマーPC04とハイブリダイズしないクリアーなブラック。

- ・ プライマー PC04 とハイブリダイズするク
リアーなブランク。

制限酵素及びサザン分析法

3つの β -グロビン陽性ブランクと2つの β -グロビン陰性ブランク（しかしPC04プライマー陽性）のファージDNAから少し調製したDNAを制限酵素分析法で分析した。増幅した β -グロビン断片を含むM13クローンからのDNAのMstII消化は特徴的な283塩基対断片を生ずる。MstII消化の後、3つの β -グロビン陽性クローンは全て予想のとおり283塩基対断片を生成し、一方プライマーとのみ陽性であった2つのクローンは大きい断片を生成した。

この分析からのゲルをMS1ナイロンフィルターに移し、リグビーらによりJ. Mol. Biol. 113巻237-51頁（1977年）に記載された標準的なニックトランスレーション法により調製した放射性ラベルを行ったニックトランスレーションした β -グロビンプローブとハイブリダイズさせた。 β -

ンのみがヘモグロビン配列を有していた。

10の内9つが公にされている β -グロビン配列と同じであることが分かり、該技術はゲノムDNAを高い忠実度で増幅することを示した。1つのクローンは公表されている δ -グロビンと同一であったことが分かり、このことはプライマーが δ -グロビンに対する有意な配列相同性を持っているにもかかわらず、 β -グロビン遺伝子に特異的であることを証明した。

クローニングを β -グロビンの267塩基対断片を用いて行う場合、このクローニングはジメチルスルフォキシドが増幅工程に存在（37℃で10容量%）するときのみ効果的であることが分かった。

制限部位-修飾プライマーを使用して、ヒトNr_{as}腫瘍遺伝子を増幅し、クローン化し、一部を配列決定することができ、更にHLA-DQ- α 及びDQ- β 遺伝子の240塩基対断片をクローン化することもできた。これら全ての増幅は10容量%のジメチルスルフォキシドの存在下

グロビンプローブとハイブリダイズできるバンドは、3つの β -グロビン陽性クローンのみであった。2つの他のクローンは β -グロビンプローブにハイブリダイズしない挿入部を有していた。

配列の分析

β -グロビン挿入部を含むことが制限酵素分析により示された10個の β -グロビン陽性クローンを、M13ジデオキシ配列決定法を用いて配列決定した。10の内9つは β -グロビンの野生型配列と同一であった。他のクローンは、 β -グロビンプライマーでは非常に僅かしか増幅しないことが示されている δ -グロビン遺伝子と同じであった。

結論として、 β -グロビン配列の増幅において、変形されたリンカープライマーは変形されていないプライマーとほぼ等しい効率を有していた。プライマーは、増幅されたDNAのクローニングベクターへの挿入を容易にすることができた。ゲノムの他のセグメントの増幅のため、1%のクロー

37℃で行った。HLA-DQ- α 及びDQ- β 遺伝子を増幅するためのプライマーは、臭化エチジウムで染色したアガロースゲル上に具体的なバンドを与えるというよりも汚れを生ずるにすぎない β -グロビンやDR- β プライマーに比べて、それらの意図する標的物に対して遙かに特異的であった。更にHLA-DQ- α プライマーは、所望のHLA標的断片を含む増幅される挿入部を有する20%までのクローンを生成し、ところが β -グロビんクローンの1%が標的配列を含んでいた。HLA-DQ- α 及びDQ- β 遺伝子クローニングはDMSOが存在し高温のときにのみ効果的であった。

実施例13

本実施例は、それぞれ74塩基対の2つのオリゴヌクレオチドから出発して494塩基対のTNF遺伝子を調製するために本法を使用することを例示するものである。

以下余白

プライマー

使用したプライマーは実施例2に記載した方法で調製し、それぞれ74塩基対を有し、下記に示すものである。

(TN10) 5'-CCTCGTCTACTCCAGGTCCTCTTCAAGGGCCA-AGGCTGCCCCGACTATGTGCTCCTCACCACACCGTCAGCC-3'

(TN11) 5'-GGCAGGGGCTCTTGACGGCAGAGAGGAGGTTGA-CCTTCTCCTGGTAGGAGATGGCGAAGCGGCTGACGGTGTGG-3'

(LL09) 5'-CCTGGCCAATGGCATGGATCTGAAAGATAACCA-GCTGGTGGTGCCAGCAGATGGCCTGTACCTCGTCTACTCCC-3'

(LL12) 5'-CTCCCTGATAGATGGGCTCATACCAGGGCTTGA-GCTCAGCCCCCTCTGGGGTGTCTTCGGGCAGGGGCTCTTG-3'

(TN08) 5'-TGTAGCAAACCATCAAGTTGAGGAGCAGCTCGA-GTGGCTGAGCCAGCGGGCCAATGCCCTCCTGGCCAATGGCA-3'

(TN13) 5'-GATACTTGGGCAGATTGACCTCAGCGCTGAGTT-GGTCAACCTTCTCCAGCTGGAAGACCCCTCCCTGATAGATG-3'

(LL07) 5'-CCTTAAGCTTATGCTCAGATCATCTTCTCAAAA-CTCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTAGCAAACCATC-3'

(TN14) 5'-GCTCGGATCCTTACAGGGCAATGACTCCAAAGT-AGACCTGCCAGACTCGGCAAGTGCAGATACTTGGGCAGA-3'

全体的手順

I. 下記に示す10サイクルのプロトコルを、プライマーとして下記ステップ(a)に概略を示すように相互作用をするプライマーTN10及び

TN11を用いて行った。

II. 上記パートIからの反応混合物全2 μ lをプライマーLL09及びLL12に加えた。下記のプロトコルを15サイクル行い、これにより下記ステップ(b)で概略を示すように、プライマーがパートIの生成物と相互作用する。

III. パートIIからの反応混合物全2 μ lをプライマーTN08及びTN13に加えた。下記のプロトコルを15サイクル行い、これにより、下記ステップ(c)で概略を示すように、プライマーがパートIIの生成物と相互作用する。

IV. 上記パートIIIからの反応混合物全2 μ lをプライマーLL07及びLL14に加えた。下記のプロトコルを15サイクル行い、これにより、下記ステップ(d)で概略を示すように、プライマーがパートIIIの生成物と相互作用をする。

プロトコル

各反応は100 μ lの、

各2mMのデオキシATP、デオキシCTP、

デオキシGTP及びTTP；

3 μ Mの各ステップで使用する各プライマー；

1 \times ポリメラーゼ緩衝液(30mMのトリスアセテート、60mMの酢酸ナトリウム、10mMの酢酸マグネシウム、2.5mMのジチオスレイトール)；

を含んでいる。

各ステップは、

1) 沸騰水中で1分、

2) 室温冷却1分、

3) DNAポリメラーゼのクレノー断片1 μ l

(5単位)添加、

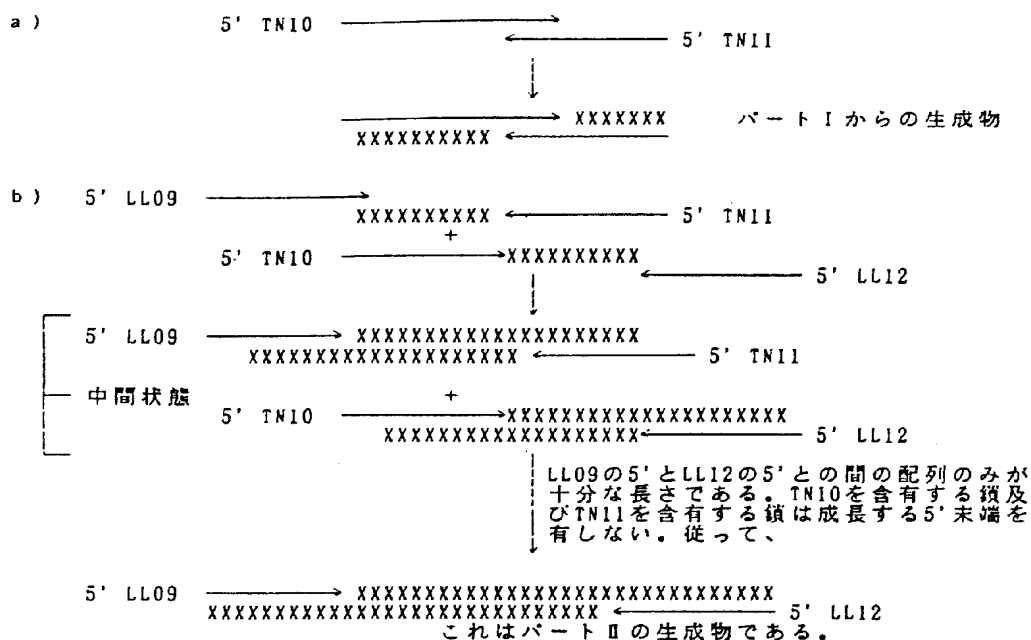
4) 重合反応の2分間の進行、

から成る。

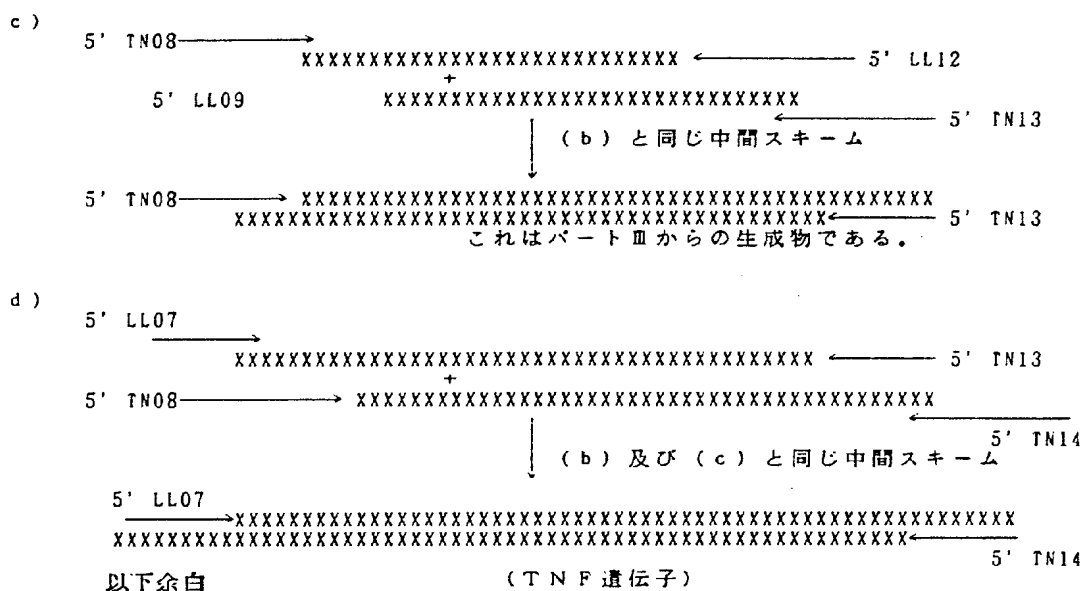
次のサイクルは再度ステップ1)から始める。

以下余白

ダイアグラム



以下余白



以下余白

材料の寄託

細胞系 SC-1 (CTCC #0082) は、1985年3月19日、米国、20852、メリーランド州ロックビルパークロンドライブ 12301に所在するアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC) に ATTT 受理番号第 CRL 8756号として寄託された。SC-1の寄託は、ATCCと本特許出願人のシータス・コーポレーションとの間の契約に従って行われた。ATCCとの契約は、本寄託を記載しかつ特定する米国特許が発行された場合又は米国又は外国特許出願が公衆に公告された場合又は公開された場合のいずれか早い方が来たときにこの細胞系の子孫を公衆がそれを永続的に利用できるようにするために提供し、更に本細胞系を利用させることについては、米国特許商標局長官が米国特許法第 122条及びそれに関する長官のルール (37 CFR 1、14条も特に 886 OG 638に関連して含む) に従って権限を持って決定した人間に対しても行う。本出願の譲受人はもし寄託した細胞系が好適な条件下で培養し

たにもかかわらず、死滅し、失われ、損傷したときは通知を受けてから迅速に同じ細胞系の育成培養基と置き換えることに同意する。

纏めると、本発明はまず1つ又はそれ以上の特定の核酸を、プライマーの伸長により生産される生成物が引き続き次のプライマーの伸長反応の鑄型としての役割を果たすような連鎖反応を用いて増幅させることにより核酸中の配列を検出するようにした方法を提供する。本法は当初にほんの僅かの量しか含まれていない核酸配列を検出するために特に有用である。更に増幅法は分子クローニングにも使用することができる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、増幅されることが望まれるヒトβ-グロビンの94塩基対長の配列を示すものであり、鎌状赤血球貧血に伴う単一塩基対変化を94merの下方に描いてある。

第2図は、ヒトの野生型DNA中、及び正常のβ-グロビン遺伝子の1.9kbのBamHI断片を含

むプラスミド (pBR328: HbA と示される) 中に含まれる上記94merの増幅を示す臭化エチジウムで染色されたポリアクリルアミドのゲルの写真である。

第3図は、pBR328: HbA、及びβ-グロビンの鎌状赤血球対立遺伝子の1.9kb BamHI断片を含むプラスミド (pBR328: HbS と称する) 中に存在する特定の標的94-mer配列のいずれかの増幅を示すポリアクリルアミドゲル電気泳動のオートラジオグラフを示し、pBR328: HbA では増幅されるべき配列がMstIIにより開裂され、そしてpBR328: HbS では増幅されるべき配列が処理されたがMstIIにより開裂されなかった。

第4図は、2つのオリゴヌクレオチドプライマーを用いる3サイクルについて、ヒトβ-グロビンの所望の94mer配列の増幅のためのポリメラーゼの連鎖反応のステップと生成物の詳細を示すものである。

第5図は、pBR328: HbA 中の240mer配列の4サイクル後の増幅を示す臭化エチジウムで染色さ

れたポリアクリルアミドのゲルを示す写真であり、ここはアリコートがNcoI (レーン3)、MstII (レーン4) 又はHinfI (レーン5) により消化される。レーン1は分子量の基準で、レーン2は無傷の240bpの生成物を含んでいる。

第6図は、DdeI及びHinfI制限部位間にある正常な(β^A) β-グロビン遺伝子及び鎌状赤血球(β^S) β-グロビン遺伝子の配列を示すもので、β^Aについての1本線はDdeI部位(CTGAG)の位置を示し、β^A及びβ^Sについての2重線はHinfI部位(GACTC)の位置を示している。

第7図は、40merプローブ、並びにDdeI及びこれに続くHinfI制限酵素を用いる正常β-グロビンの逐次的な消化の結果を示すものである。

第8図は、第7図と同じ40merプローブ並びにDdeI及びこれに続くHinfI制限酵素を使用する鎌状β-グロビンの逐次的な消化の結果を示すものである。

第9図は、増幅、プローブとのハイブリダイゼーション、及びDdeIとHinfIによる逐次的消化

を受けた全ヒトDNAの試料中に存在するβ-グロビン対立遺伝子の特異的に特徴付けるための、第7図と同じ40-merプローブの使用を示す、臭化エチジウムで染色されたポリアクリルアミドのゲルを示す写真である。

第10図は、臭化エチジウムと紫外線を用いて視覚化した6%のNuシーブアガロースゲルの写真を示すものである。この写真は、110-bp増幅生成物のサブフラグメントの増幅を示し、このサブフラグメントは110bp断片内の内部ネストである。

特許出願人

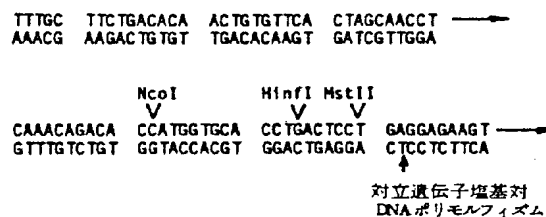
シラクス コーポレイション

特許出願代理人

弁理士 青 木 朗
弁理士 西 舘 和 之
弁理士 福 本 積
弁理士 山 口 昭 之
弁理士 西 山 雅 也

FIG.1

2重鎖94-bp配列



CTGCCGTTAC TGCCCTGTG
GACGGCAATG ACGGGACAC



FIG.2

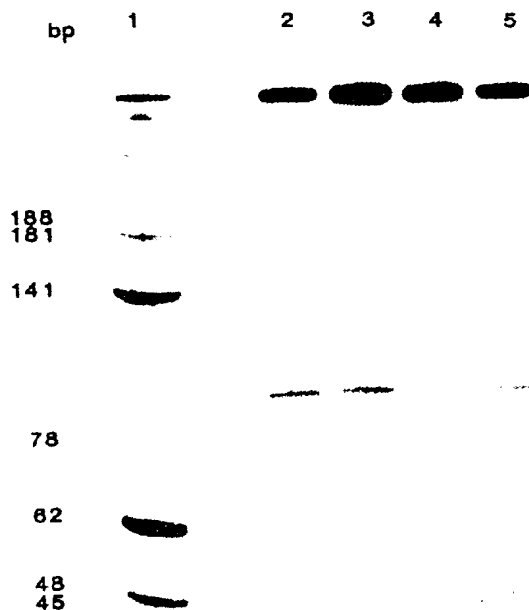
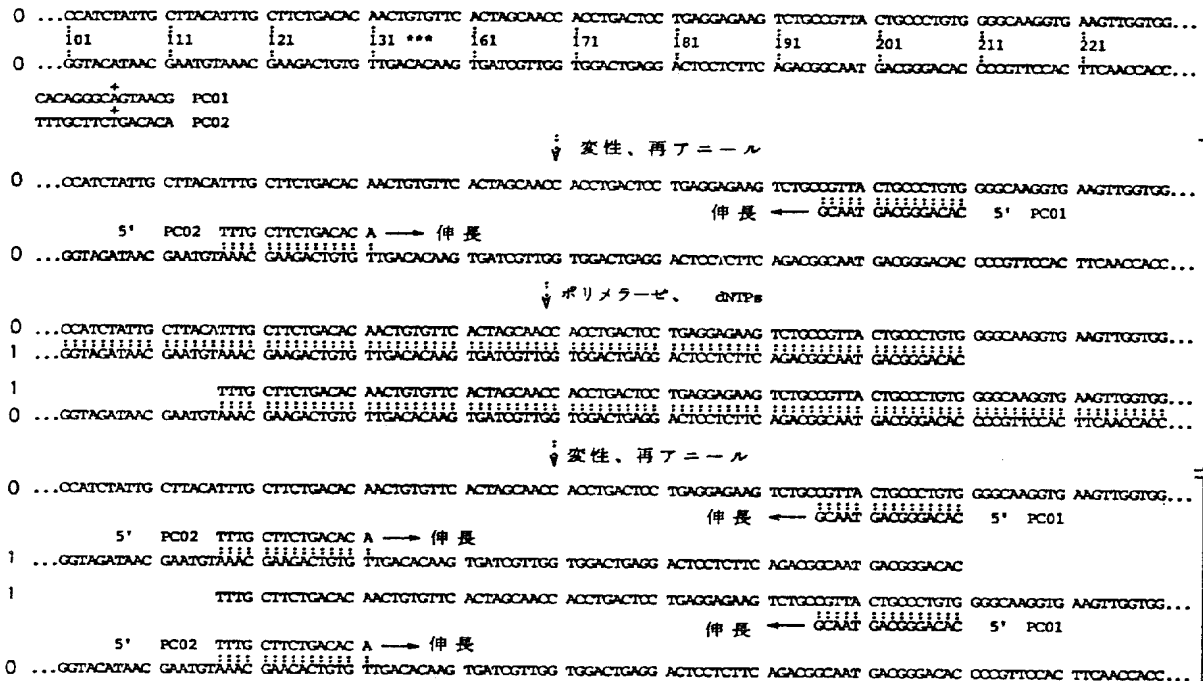


FIG.3

図面の浄書(内容に変更なし)

ヒト-β-グロビン

FIG.4-1



図面の浄書(内容に変更なし)

FIG.4-2

↓ ポリメラーゼ dNTPs



図面の浄書(内文に本頁を1.1)

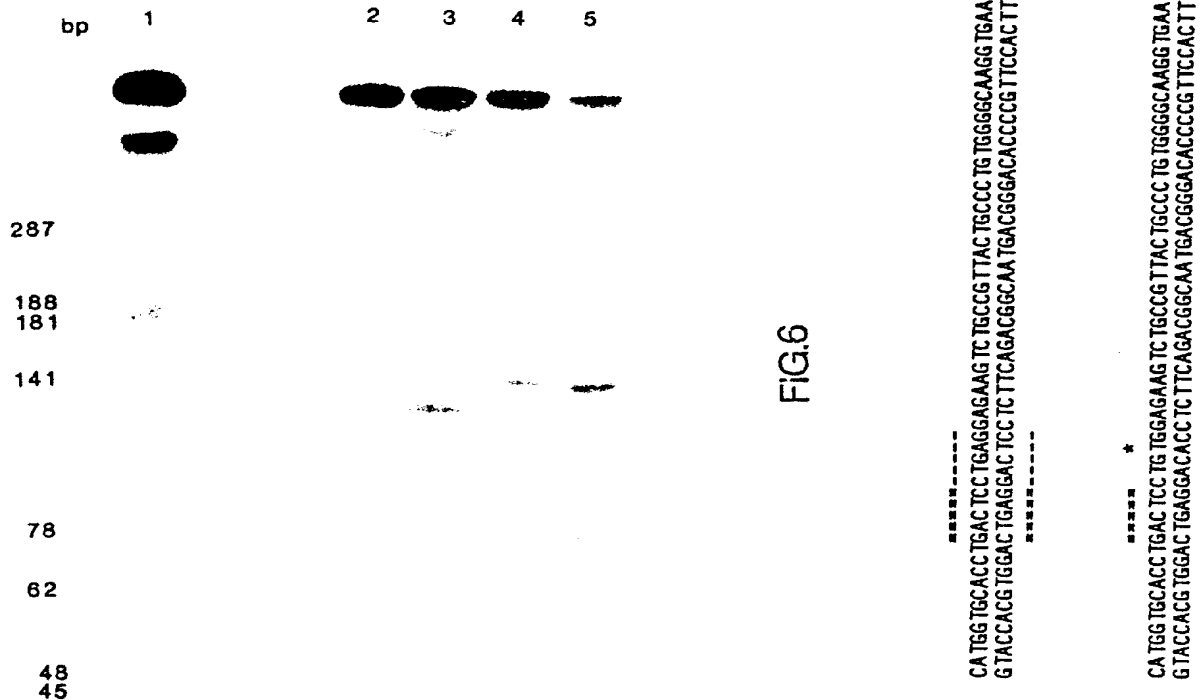
FIG.4-3

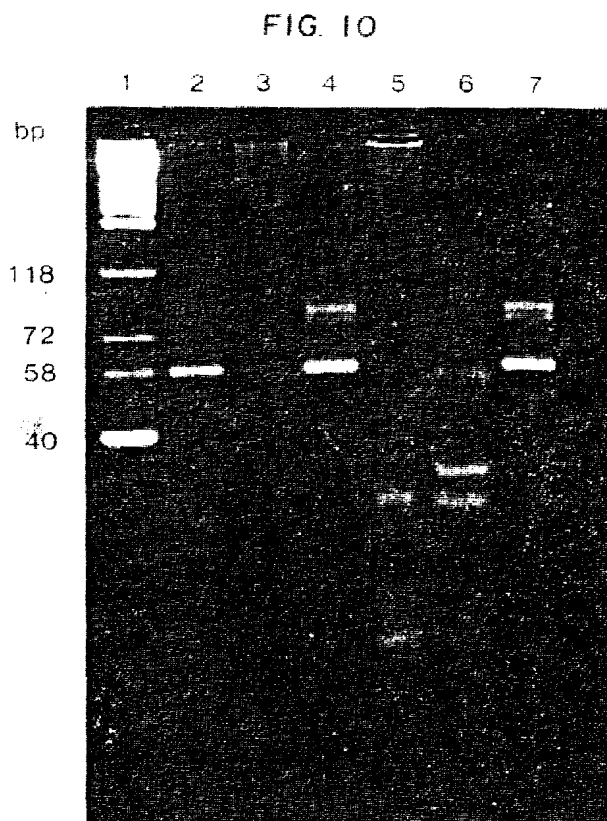
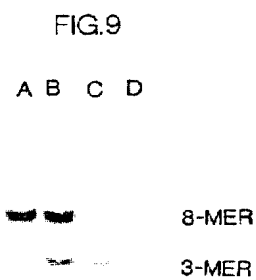
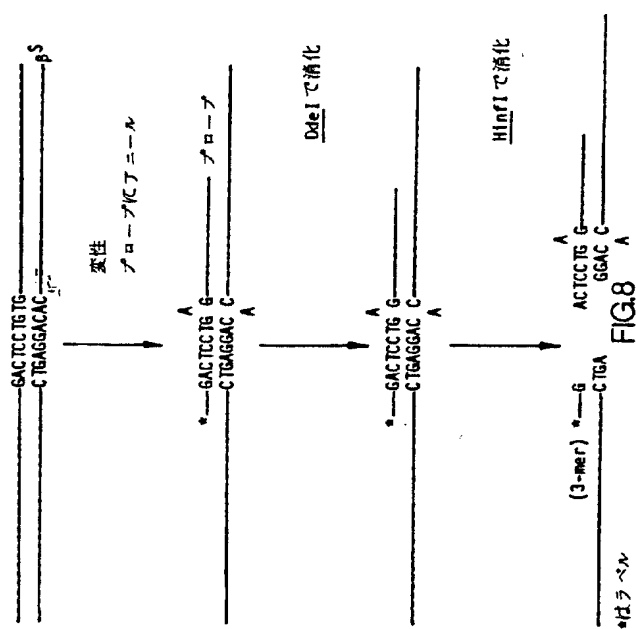
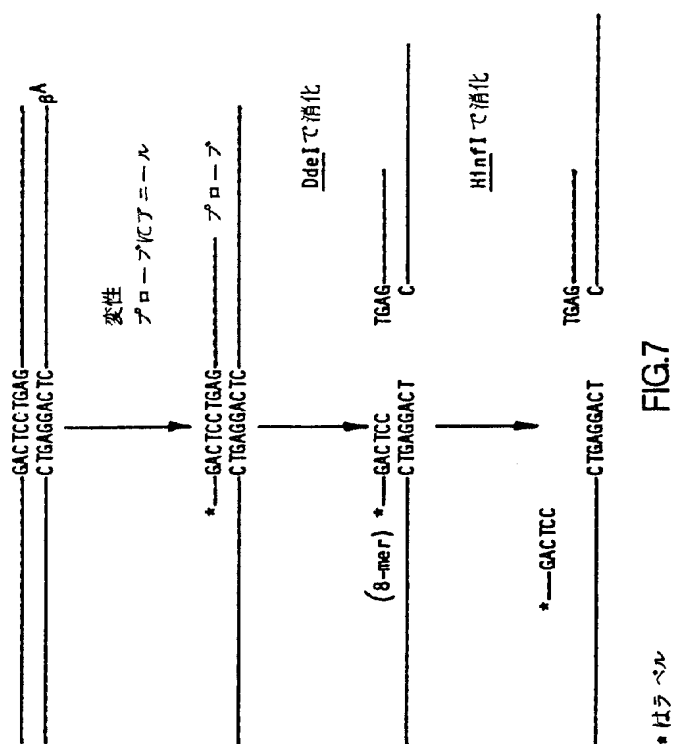
ポリメラーゼ α⁺ dNTPs

0	...	GCATCTATTG	CTTACATTTG	CTTCTGACAC	AACGTGTGTC	ACTAGCAACC	ACCTGACTCC	TGAGGAGAAG	TCTGCGGTGA	CTGCGCTGTG	GGGCAAGGTG	AAGTTGGTGG...
3		GGTAGATAAC	GAATGTAAAC	GAAGACTGTG	TTGACACAAG	TGATCGTTGG	TGGACTGAGG	ACTCTCTCTC	AGAAGGCAAT	GACGGGACAC
3			TTTG	CTTCTGACAC	AACGTGTGTC	ACTAGCAACC	ACCTGACTCC	TGAGGAGAAG	TCTGCGGTGA	CTGCGCTGTG
2	...	GGTAGATAAC	GAATGTAAAC	GAAGACTGTG	TTGACACAAG	TGATCGTTGG	TGGACTGAGG	ACTCTCTCTC	AGAAGGCAAT	GACGGGACAC
2			TTTG	CTTCTGACAC	AACGTGTGTC	ACTAGCAACC	ACCTGACTCC	TGAGGAGAAG	TCTGCGGTGA	CTGCGCTGTG
3			AAAC	GAAGACTGTG	TTGACACAAG	TGATCGTTGG	TGGACTGAGG	ACTCTCTCTC	AGAAGGCAAT	GACGGGACAC
3			TTTG	CTTCTGACAC	AACGTGTGTC	ACTAGCAACC	ACCTGACTCC	TGAGGAGAAG	TCTGCGGTGA	CTGCGCTGTG
1	GGTAGATAAC	GAATGTAAAC	GAAGACTGTG	TTGACACAAG	TGATCGTTGG	TGGACTGAGG	ACTCTCTCTC	AGAAGGCAAT	GACGGGACAC
1			TTTG	CTTCTGACAC	AACGTGTGTC	ACTAGCAACC	ACCTGACTCC	TGAGGAGAAG	TCTGCGGTGA	CTGCGCTGTG	GGGCAAGGTG	AAGTTGGTGG...
3			AAAC	GAAGACTGTG	TTGACACAAG	TGATCGTTGG	TGGACTGAGG	ACTCTCTCTC	AGAAGGCAAT	GACGGGACAC
3			TTTG	CTTCTGACAC	AACGTGTGTC	ACTAGCAACC	ACCTGACTCC	TGAGGAGAAG	TCTGCGGTGA	CTGCGCTGTG
2			AAAC	GAAGACTGTG	TTGACACAAG	TGATCGTTGG	TGGACTGAGG	ACTCTCTCTC	AGAAGGCAAT	GACGGGACAC
2			TTTG	CTTCTGACAC	AACGTGTGTC	ACTAGCAACC	ACCTGACTCC	TGAGGAGAAG	TCTGCGGTGA	CTGCGCTGTG	GGGCAAGGTG	AAGTTGGTGG...
3			AAAC	GAAGACTGTG	TTGACACAAG	TGATCGTTGG	TGGACTGAGG	ACTCTCTCTC	AGAAGGCAAT	GACGGGACAC
3			TTTG	CTTCTGACAC	AACGTGTGTC	ACTAGCAACC	ACCTGACTCC	TGAGGAGAAG	TCTGCGGTGA	CTGCGCTGTG	GGGCAAGGTG	AAGTTGGTGG...
0	...	GGTAGATAAC	GAATGTAAAC	GAAGACTGTG	TTGACACAAG	TGATCGTTGG	TGGACTGAGG	ACTCTCTCTC	AGAAGGCAAT	GACGGGACAC	CCCGTTTCAC	TTCAACACC...

N サイクル後の DNA 配列のコピー数

N	0	1	5	10	15	20
鋳型	1	1	1	1	1	1
長い生成物	0	1	5	10	15	20
短い生成物 = 2(exp N) - N - 1	0	0	26	1013	32,752	1,048,555





第1頁の続き

⑤Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号
G 01 N 33/50		8305-2G
33/58		8305-2G

優先権主張 ⑫1985年10月25日⑬米国(US)⑭791308

⑫1986年2月7日⑬米国(US)⑭828144

⑯発明者 グレン トマス ホー アメリカ合衆国, カリフォルニア 94608, エメレイビル, アドミラル ドライブ エフ370, 3

⑯発明者 ランダル ケイチ サ アメリカ合衆国, カリフォルニア 94805, リッチモンド, サーティナインズストリート 320

⑯発明者 ステファン ジョエル アメリカ合衆国, カリフォルニア 94709, バークレイ, スカーフ フランシスコ ストリート20281/2

手続補正書(方式)

昭和61年6月25日

特許庁長官 宇賀道郎 殿

1. 事件の表示

昭和61年 特許願 第068858号

2. 発明の名称

核酸配列の増幅及び検出方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 シタス コーポレーション

4. 代理人

住所 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号 静光虎ノ門ビル
〒105 電話(504)0721

氏名 弁理士(6579) 青木

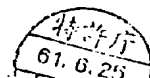
朗

(外 4 名)



5. 補正命令の日付

昭和61年5月27日(発送日)



6. 補正の対象

図面 (第4図)

7. 補正の内容

図面の浄書(内容に変更なし)

8. 添付書類の目録

浄書図面 (第4図)

1 通

特許法第17条の2の規定による補正の掲載

昭和 61 年特許願第 68858 号(特開 昭
61-274697 号, 昭和 61 年 12 月 4 日
発行 公開特許公報 61-2747 号掲載)につ
いては特許法第17条の2の規定による補正があっ
たので下記のとおり掲載する。 1 (1)

昭和 63 年 11 月 18 日

特許庁長官 吉 田 文 毅 殿

Int. Cl. 4	識別記号	庁内整理番号
C12Q 1/00		6807-4B
C07H 21/00		7417-4C
C12N 15/00		8412-4B
G01N 33/50		8305-2G
33/58		8305-2G

1. 事件の表示

昭和 61 年特許願第 068858 号

2. 発明の名称

核酸配列の増幅及び検出方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 シタス コーポレイション

4. 代 理 人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号

静光虎ノ門ビル 電話 504-0721

氏名 弁理士(6579) 青 木 朗

(外4名)

5. 補正により増加する発明の数 2

6. 補正の対象

- (1) 明細書の「特許請求の範囲」の欄
- (2) 明細書の「発明の詳細な説明」の欄
- (3) 受託証

7. 補正の内容

- (1) 特許請求の範囲を別紙の通りに補正する。
- (2) ① 明細書第14頁第16行目～第21頁第19行目「更に特定すると、……方法に関する。」を次の通りに補正する。

「本発明は特に、1種類の核酸又は複数種類の核酸の混合物を含むと予想される試料中の少なくとも1種類の特定の二重鎖核酸配列が存在するか否かを検出し、あるいは試料中の2種類の異なる配列を区別する方法であって、

(a) 増幅されるべき各異なる特定の配列の各鎖につき1種類のオリゴヌクレオチドプライマーにより、増幅されるべき各異なる配列の各鎖について各核酸鎖に相補的な各プライマーの伸長生成物が合成されるようなハイブリダイゼーション条件下で、前記試料を処理し、ここで、前記プライ

マーは各特定の配列の鎖に実質的に相補的であって1つのプライマーから合成された伸長生成物がその相補体から分離された場合に該伸長生成物が他のプライマーの伸長生成物の合成の誘型として機能するように選択され；

(b) 検出すべき配列が存在すれば誘型からプライマーの伸長生成物が分離するように変性条件下で前記試料を処理し；

(c) 前記試料を、オリゴヌクレオチドプライマーにより、ステップ(b)で生成した各単鎖を誘型として使用してプライマーの伸長生成物が合成されるように処理して、もし存在するならば前記特定の配列の増幅を惹起し；

(d) ステップ(c)の生成物に、検出されるべき各配列について該配列又はその変異体とハイブリダイズすることができる標識されたオリゴヌクレオチドプローブを加え；そして、

(e) 該ハイブリダイゼーションが生じたか否かを決定する；

ことを含んで成る方法を提供する。

本発明はまた、1種類の核酸又は複数種類の核酸の混合物を含むと予想される試料中の少なくとも1種類の特定の単鎖核酸配列が存在するか否かを検出し、あるいは試料中の2種類の異なる配列を区別する方法であって、

(a) ^{増幅されるべき各異なる配列につき}2種類のオリゴヌクレオチドプライマーにより、増幅されるべき各異なる配列の各鎖について各核酸鎖に相補的な一方のプライマーの伸長生成物が合成されるようなハイブリダイゼーション条件下で、前記試料を処理し、ここで、前記2種類のプライマーは1方のプライマーから合成された伸長生成物とその相補体から分離された場合に該伸長生成物が他方のプライマーの伸長生成物の合成の誘型として機能するように選択され；

(b) 検出すべき配列が存在すれば誘型からプライマーの伸長生成物が分離するように変性条件下で前記試料を処理し；

(c) 前記試料を、オリゴヌクレオチドプライマーにより、ステップ(b)で生成した各単鎖を誘型として使用してプライマーの伸長生成物が合

いての各オリゴヌクレオチドプライマーのための容器(このプライマーは各特定の核酸配列の各鎖に実質的に相補的であって、1つのプライマーから合成された伸長生成物とその相補体から分離されたときに該伸長生成物が他のプライマーの伸長生成物合成用の誘型として機能することができる)；

(b) 重合試薬を収容する容器；

(c) 4種類の異なる各ヌクレオチド三リン酸用の容器；

(d) 前記配列が試料中に含まれるならばその配列とハイブリダイズすることができる標識されたオリゴヌクレオチドプローブを収容する容器；及び、

(e) 該プローブと該配列のハイブリッドを検出する手段を収容する容器；を有するキットを提供する。このキットは好ましい態様において、パッケージタイプの多容器型ユニットとして構成される。

本発明は他の態様において、1種類の核酸又は複数種類の核酸の混合物中に含まれる特定の二重

成されるように処理して、もし存在するならば前記特定の配列の増幅を惹起し；

(d) ステップ(c)の生成物に、検出されるべき各配列について該配列又はその変異体とハイブリダイズすることができる標識されたオリゴヌクレオチドプローブを加え；そして、

(e) 該ハイブリダイゼーションが生じたか否かを決定する；ことを含んで成る方法を提供する。

前記各方法において、ステップ(a)から(c)は、逐次的に行うこともでき、又同時的に行うこともできる。さらに、ステップ(b)及び(c)は配列の増幅が所望のレベルに達するまで繰り返すことができる。

本発明は他の態様において、

1種類又は2種類以上の核酸を含むと予想される試料中の少なくとも1つの特定の核酸配列(該核酸の少なくとも1つがこの配列を含有すると思われる)を検出するためのキットであって、

(a) 検出されるべき各異なる配列の各鎖につ

鎖核酸配列をベクター中にクローニングする方法であって、

(a) 増幅されるべき各異なる特定の配列の各鎖につき1種類のオリゴヌクレオチドプライマーにより、増幅されるべき各異なる特定の配列の各鎖について各核酸鎖に相補的な各プライマーの伸長生成物が合成されるような条件下で、前記核酸を処理し、ここで、前記プライマーは各特定の配列の鎖に実質的に相補的であって1つのプライマーから合成された伸長生成物とその相補体から分離されたときに該伸長生成物が他のプライマーの伸長生成物の合成の誘型として機能するように選択され、更に該プライマーはそれぞれその5'末端に、他のプライマーの制限部位と同じか異なる制限部位を有しており；

(b) プライマー伸長生成物をそれらがその上で合成された誘型から分離して単鎖分子を生成せしめ；

(c) ステップ(b)で生産された単鎖分子をオリゴヌクレオチドにより処理して、ステップ

(b) で生成された各単鎖を鋳型として使用してプライマー伸長生成物が合成されるようにし、ここで増幅されるべき特定の配列に依存してステップ (a) と (c) を 0 から有効量までのジメチルスルフォキシドの存在下、あるいは約 45℃までの温度のもとで行い；

(d) ステップ (c) の生成物に各制限部位用の制限酵素を加えて、制限酵素消化物中に開裂した生成物を得、そして、

(e) 開裂した生成物を 1 又は 2 以上のクローニングベクターに連結する；
ことを含んで成る方法を提供する。

本発明はさらに、1 種類の核酸又は複数種類の核酸の混合物中に含まれる特定の単鎖核酸配列をベクター中にクローニングする方法であって、

(a) 2 種類のオリゴヌクレオチドプライマーにより、増幅されるべき各異なる配列について各核酸鎖に相補的な一方のプライマーの伸長生成物が合成されるような条件下で、前記核酸を処理し、ここで、前記プライマーは一方のプライマーから

合成された伸長生成物とその相補体から分離されたときに該伸長生成物が他方のプライマーの伸長生成物の合成の鋳型として機能するように選択され、更に該プライマーはそれぞれの 5' 末端に、他のプライマーの制限部位と同じか異なる制限部位を有しており；

(b) プライマー伸長生成物をそれらがその上で合成された鋳型から分離して単鎖分子を生成せしめ；

(c) ステップ (b) で生産された単鎖分子をオリゴヌクレオチドにより処理して、ステップ

(b) で生成された各単鎖を鋳型として使用してプライマー伸長生成物が合成されるようにし、ここで増幅されるべき特定の配列に依存してステップ (a) と (c) を 0 から有効量までのジメチルスルフォキシドの存在下、あるいは約 45℃までの温度のもとで行い；

(d) ステップ (c) の生成物に各制限部位用の制限酵素を加えて、制限酵素消化物中に開裂した生成物を得、そして、

(e) 開裂した生成物を 1 又は 2 以上のクローニングベクターに連結する；
ことを含んで成る方法を提供する。

本発明は他の態様において、合成すべき核酸断片より少ないヌクレオチドを有する既存の核酸断片と 2 種類のオリゴヌクレオチドプライマーとから核酸断片を合成する方法であって、該合成すべき核酸は左方のセグメント、中央のセグメント及び右方のセグメントから成り、該中央のセグメントは少なくとも実質的に前記既存の核酸断片のヌクレオチド配列に相当し、左右のセグメントは前記 2 種類のプライマーの 5' 末端に存在するヌクレオチド配列に相当し、これらの 3' 末端は前記既存の核酸の鎖を分離することにより生ずる単鎖の 3' 末端に相補的かあるいは実質的に相補的であり；そして、

(a) 各核酸鎖に相補的である各プライマーの伸長生成物が合成されるような条件下で、前記既存断片の鎖を 2 種類のオリゴヌクレオチドプライマーで処理し、ここで、該 2 種類のプライマーは、

前記既存断片の各鎖の 3' 末端と実質的に相補的であって、一方のプライマーから合成された伸長生成物とその相補体から分離されたときに該伸長生成物が他方のプライマーの伸長生成物の合成のための鋳型として機能するように選択され、そして各プライマーはその 5' 末端に、前記既存断片と相補的でなく且つ合成すべき核酸断片の 2 つの末端に対応するヌクレオチドの配列を含むものであり；

(b) その上でプライマー伸長生成物が生成された鋳型から該プライマー伸長生成物を分離して単鎖分子を生成せしめ；そして

(c) ステップ (b) において生成した各単鎖を鋳型として用いてプライマー伸長生成物が合成される条件下で、ステップ (b) から生じた単鎖分子をステップ (a) のプライマーにより処理し、こうして 2 つの中間二重鎖核酸分子（このそれぞれは、オリゴヌクレオチドプライマーの一方の 5' 末端に存在する核酸配列が導入されている）と 2 つの十分な長さの核酸分子（このそれぞれには、

オリゴヌクレオチドプライマーの両方の 5' 末端に存在する核酸配列が導入されている) とを生成せしめ;

(d) 前記十分な長さの二重鎖分子の有効量を生産するのに十分な回数ステップ (b) とステップ (c) を繰り返す;

(e) ステップ (d) の生成物の鎖を 2 つのプライマーで処理して、ステップ (d) の生成物が両末端において伸びるように処理し;そして、

(f) 中央セグメントとしてのステップ (d) の生成物と、ステップ (d) の生成物の鎖を分離することにより生成する単鎖の 3' 末端と相補的か実質的に相補的である 2 つのオリゴヌクレオチドプライマーとを使用しながらステップ (a) からステップ (d) までを繰り返す;

ことを含んで成る方法を提供する。」

② 同第 23 頁第 12 行目、第 24 頁第 13 行目、第 24 頁第 15 行目、第 24 頁第 19 行目、第 25 頁第 2 行目、及び第 28 頁第 14 行目「ストランド」を「鎖」に補正する。

③ 同第 26 頁第 7 行目「比較して」を「関して」に補正する。

④ 同第 28 頁第 20 行目「核酸中へ」を「核酸に」に補正する。

⑤ 同第 47 頁第 6 行目「分析」を「の分析」に補正する。

⑥ 同第 48 頁第 2 行目「含む配」を「含む配列」に補正する。

⑦ 同第 49 頁第 4 行目「が配列」を「部位が配列」に補正する。

⑧ 同第 49 頁第 5 行目「形成するために」を「形成することにより」に補正する。

⑨ 同第 57 頁第 11 行目「暗示する。」を「意味する。」に補正する。

⑩ 同第 64 頁第 19 行目「に伸びる」を「を含む」に補正する。

⑪ 同第 80 頁第 20 行目「個体当」を「個体から最」に補正する。

⑫ 当第 106 頁第 1 行目「TABLE II」を「表 II」に補正する。

(3) 受託証及びその抄訳各 2 通を提出する。

7. 添付書類の目録

- | | |
|---------------|-------|
| (1) 特許請求の範囲 | 1 通 |
| (2) 受託証及びその抄訳 | 各 2 通 |

2. 特許請求の範囲

1. 1 種類の核酸又は複数種類の核酸の混合物を含むと予想される試料中の少なくとも 1 種類の特定の二重鎖核酸配列が存在するかどうかを検出し、あるいは試料中の 2 種類の異なる配列を区別する方法であって、

(a) 増幅されるべき各異なる特定の配列の各鎖につき 1 種類のオリゴヌクレオチドプライマーにより、増幅されるべき各異なる配列の各鎖について各核酸鎖に相補的な各プライマーの伸長生成物が合成されるようなハイブリダイゼーション条件下で、前記試料を処理し、ここで、前記プライマーは各特定の配列の鎖に実質的に相補的であって 1 つのプライマーから合成された伸長生成物がその相補体から分離された場合に該伸長生成物が他のプライマーの伸長生成物の合成の鋳型として機能するように選択され;

(b) 検出すべき配列が存在すれば鋳型からプライマーの伸長生成物が分離するように変性条件下で前記試料を処理し;

平成 1. 3. 2 発行

Klenow断片、T4 DNAポリメラーゼ、耐熱性酵素又は逆転写酵素である特許請求の範囲第2項に記載の方法。

4. 前記核酸がステップ(a)の前に変性により分離される特許請求の範囲第1項～第3項のいずれか1項に記載の方法。

5. 前記核酸がDNAであり、そしてプライマーがデオキシリボヌクレオチドである特許請求の範囲第1項～第4項のいずれか1項に記載の方法。

6. 使用される各プライマーが、その5'末端に他のプライマーの制限部位と同じか異なる制限部位を有し、そしてステップ(c)の後であってステップ(d)の前に該各制限部位に特異的な制限酵素によりステップ(c)の生成物を開裂させ、該開裂した生成物を開裂していない生成物と分離し、そしてステップ(d)で使用する特許請求の範囲第1項～第5項のいずれか1項に記載の方法。

7. 前記特定の核酸配列が遺伝子疾患、癌性疾患又は伝染性疾患と関連している特許請求の範囲第1項～第6項のいずれか1項に記載の方法。

(c) 前記試料を、オリゴヌクレオチドプライマーにより、ステップ(b)で生成した各単鎖を鋳型として使用してプライマーの伸長生成物が合成されるように処理して、もし存在するならば前記特定の配列の増幅を惹起し；

(d) ステップ(c)の生成物に、検出されるべき各配列について該配列又はその変異体とハイブリダイズすることができる標識されたオリゴヌクレオチドプローブを加え；そして、

(e) 該ハイブリダイゼーションが生じたか否かを決定する；
ことを含んで成る方法。

2. ステップ(b)及び(c)は少なくとも1回繰り返され、そしてステップ(a)及び(c)は、プライマーと一緒に又は別に加えられる4種類の異なるヌクレオチド三リン酸及び重合用試薬により処理することによって行われるものである特許請求の範囲第1項に記載の方法。

3. 前記重合用試薬がE. コリ(E.coli) DNAポリメラーゼ、E. コリDNAポリメラーゼIの

8. 1種類又は2種類以上の核酸を含むと予想される試料中の少なくとも1つの特定の二重鎖核酸配列(該核酸の少なくとも1つがこの配列を含有すると思われる)を検出するためのキットであって、

(a) 検出されるべき各異なる配列の各鎖についての各オリゴヌクレオチドプライマーのための容器(このプライマーは各特定の核酸配列の各鎖に実質的に相補的であって、1つのプライマーから合成された伸長生成物とその相補体から分離されたときに該伸長生成物が他のプライマーの伸長生成物合成用の鋳型として機能することができる)；

(b) 重合試薬を収容する容器；

(c) 4種類の異なる各ヌクレオチド三リン酸用の容器；

(d) 前記配列が試料中に含まれるならばその配列とハイブリダイズすることができる標識されたオリゴヌクレオチドプローブを収容する容器；
及び、

(e) 該プローブと該配列のハイブリッドを検

出する手段を収容する容器；
を有するキット。

9. 1種類の核酸又は複数種類の核酸の混合物中に含まれる特定の二重鎖核酸配列をベクター中にクローニングする方法であって、

(a) 増幅されるべき各異なる特定の配列の各鎖につき1種類のオリゴヌクレオチドプライマーにより、増幅されるべき各異なる特定の配列の各鎖について各核酸鎖に相補的な各プライマーの伸長生成物が合成されるような条件下で、前記核酸を処理し、ここで、前記プライマーは各特定の配列の鎖に実質的に相補的であって1つのプライマーから合成された伸長生成物とその相補体から分離されたときに該伸長生成物が他のプライマーの伸長生成物の合成鋳型として機能するように選択され、更に該プライマーはそれぞれの5'末端に、他のプライマーの制限部位と同じか異なる制限部位を有しており；

(b) プライマー伸長生成物をそれらがその上で合成された鋳型から分離して単鎖分子を生成せ

しめ；

(c) ステップ (b) で生産された単鎖分子をオリゴヌクレオチドにより処理して、ステップ

(b) で生成された各単鎖を鋳型として使用してプライマー伸長生成物が合成されるようにし、ここで増幅されるべき特定の配列に依存してステップ (a) と (c) を 0 から有効量までのジメチルスルフォキシドの存在下、あるいは約 45℃ までの温度のもとで行い；

(d) ステップ (c) の生成物に各制限部位用の制限酵素を加えて、制限酵素消化物中に開裂した生成物を得、そして、

(e) 開裂した生成物を 1 又は 2 以上のクロニングベクターに連結する；
ことを含んで成る方法。

10. 合成すべき核酸断片より少ないヌクレオチドを有する既存の核酸断片と 2 種類のオリゴヌクレオチドプライマーとから核酸断片を合成する方法であって、該合成すべき核酸は左方のセグメント、中央のセグメント及び右方のセグメントから

(b) その上でプライマー伸長生成物が生成された鋳型から該プライマー伸長生成物を分離して単鎖分子を生成せしめ；そして

(c) ステップ (b) において生成した各単鎖を鋳型として用いてプライマー伸長生成物が合成される条件下で、ステップ (b) から生じた単鎖分子をステップ (a) のプライマーにより処理し、こうして 2 つの中間二重鎖核酸分子（このそれぞれは、オリゴヌクレオチドプライマーの一方の 5' 末端に存在する核酸配列が導入されている）と 2 つの十分な長さの核酸分子（このそれぞれには、オリゴヌクレオチドプライマーの両方の 5' 末端に存在する核酸配列が導入されている）とを生成せしめ；

(d) 前記十分な長さの二重鎖分子の有効量を生産するのに十分な回数ステップ (b) とステップ (c) を繰り返す；

(e) ステップ (d) の生成物の鎖を 2 つのプライマーで処理して、ステップ (d) の生成物が両末端において伸びるように処理し；そして、

成り、該中央のセグメントは少なくとも実質的に前記既存の核酸断片のヌクレオチド配列に相当し、左右のセグメントは前記 2 種類のプライマーの 5' 末端に存在するヌクレオチド配列に相当し、これらの 3' 末端は前記既存の核酸の鎖を分離することにより生ずる単鎖の 3' 末端に相補的かあるいは実質的に相補的であり；そして、

(a) 各核酸鎖に相補的である各プライマーの伸長生成物が合成されるような条件下で、前記既存断片の鎖を 2 種類のオリゴヌクレオチドプライマーで処理し、ここで、該 2 種類のプライマーは、前記既存断片の各鎖の 3' 末端と実質的に相補的であって、一方のプライマーから合成された伸長生成物とその相補体から分離されたときに該伸長生成物が他方のプライマーの伸長生成物の合成のための鋳型として機能するように選択され、そして各プライマーはその 5' 末端に、前記既存断片と相補的でなく且つ合成すべき核酸断片の 2 つの末端に対応するヌクレオチドの配列を含むものであり；

(f) 中央セグメントとしてのステップ (d) の生成物と、ステップ (d) の生成物の鎖を分離することにより生成する単鎖の 3' 末端と相補的か実質的に相補的である 2 つのオリゴヌクレオチドプライマーとを使用しながらステップ (a) からステップ (d) までを繰り返す；
ことを含んで成る方法。

11. 1 種類の核酸又は複数種類の核酸の混合物を含むと予想される試料中の少なくとも 1 種類の特定の単鎖核酸配列が存在するか否かを検出し、あるいは試料中の 2 種類の異なる配列を区別する方法であって、

(a) ^{増幅されるべき各核酸鎖につき} 2 種類のオリゴヌクレオチドプライマーにより、増幅されるべき各異なる配列の各鎖について各核酸鎖に相補的な一方のプライマーの伸長生成物が合成されるようなハイブリダイゼーション条件下で、前記試料を処理し、ここで、前記 2 種類のプライマーは 1 方のプライマーから合成された伸長生成物とその相補体から分離された場合に該伸長生成物が他方のプライマーの伸長生成物

平成 1. 3. 2 発行

の合成の鋳型として機能するように選択され；

(b) 検出すべき配列が存在すれば鋳型からプライマーの伸長生成物が分離するように変性条件下で前記試料を処理し；

(c) 前記試料を、オリゴヌクレオチドプライマーにより、ステップ(b)で生成した各単鎖を鋳型として使用してプライマーの伸長生成物が合成されるように処理して、もし存在するならば前記特定の配列の増幅を惹起し；

(d) ステップ(c)の生成物に、検出されるべき各配列について該配列又はその変異体とハイブリダイズすることができる標識されたオリゴヌクレオチドプローブを加え；そして、

(e) 該ハイブリダイゼーションが生じたか否かを決定する；
ことを含んで成る方法。

12. ステップ(b)及び(c)は少なくとも1回繰り返され、そしてステップ(a)及び(c)は、プライマーと一緒に又は別に加えられる4種類の異なるヌクレオチド三リン酸及び重合用試薬

16. 前記特定の核酸配列が遺伝子性疾患、癌性疾患又は伝染性疾患と関連している特許請求の範囲第11項～第15項のいずれか1項に記載の方法。

17. 1種類の核酸又は複数種類の核酸の混合物中に含まれる特定の単鎖核酸配列をベクター中にクローニングする方法であって、

(a) 2種類のオリゴヌクレオチドプライマーにより、増幅されるべき各異なる配列について各核酸鎖に相補的な一方のプライマーの伸長生成物が合成されるような条件下で、前記核酸を処理し、ここで、前記プライマーは一方のプライマーから合成された伸長生成物とその相補体から分離されたときに該伸長生成物が他方のプライマーの伸長生成物の合成の鋳型として機能するように選択され、更に該プライマーはそれぞれの5'末端に、他のプライマーの制限部位と同じか異なる制限部位を有しており；

(b) プライマー伸長生成物をそれらがその上で合成された鋳型から分離して単鎖分子を生成せ

により処理することによって行われるものである特許請求の範囲第11項に記載の方法。

13. 前記重合用試薬がE. コリ(E.coli)DNAポリメラーゼ、E. コリDNAポリメラーゼIのKlenow断片、T4DNAポリメラーゼ、耐熱性酵素又は逆転写酵素である特許請求の範囲第12項に記載の方法。

14. 前記核酸がRNAであり、そしてプライマーがデオキシリボヌクレオチドである特許請求の範囲第11項～第13項のいずれか1項に記載の方法。

15. 使用される各プライマーが、その5'末端に他のプライマーの制限部位と同じか異なる制限部位を有し、そしてステップ(c)の後であってステップ(d)の前に該各制限部位に特異的な制限酵素によりステップ(c)の生成物を開裂させ、該開裂した生成物を開裂していない生成物と分離し、そしてステップ(d)で使用する特許請求の範囲第11項～第14項のいずれか1項に記載の方法。

しめ；

(c) ステップ(b)で生産された単鎖分子をオリゴヌクレオチドにより処理して、ステップ

(b)で生成された各単鎖を鋳型として使用してプライマー伸長生成物が合成されるようにし、ここで増幅されるべき特定の配列に依存してステップ(a)と(c)を0から有効量までのジメチルスルフォキシドの存在下、あるいは約45℃までの温度のもとで行い；

(d) ステップ(c)の生成物に各制限部位用の制限酵素を加えて、制限酵素消化物中に開裂した生成物を得、そして、

(e) 開裂した生成物を1又は2以上のクローニングベクターに連結する；
ことを含んで成る方法。